



Taxonomie et diagnostic des espèces de *Xanthomonas* associées à la gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* spp. : situation dans les Îles du Sud Ouest de l'océan Indien

Abdou Azali Hamza

► To cite this version:

Abdou Azali Hamza. Taxonomie et diagnostic des espèces de *Xanthomonas* associées à la gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* spp. : situation dans les Îles du Sud Ouest de l'océan Indien. Sciences agricoles. Université de la Réunion, 2010. Français. NNT : 2010LARE0022 . tel-00819814

HAL Id: tel-00819814

<https://theses.hal.science/tel-00819814>

Submitted on 2 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LA RÉUNION
Faculté des Sciences et Technologies

UMR Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical
CIRAD – Université de la Réunion

THÈSE
Pour obtenir le diplôme de
DOCTORAT

Microbiologie spécialité Phytopathologie
Formation doctorale : Ecole Doctorale Interdisciplinaire E.D.I. n°0445

Taxonomie et diagnostic des espèces de
Xanthomonas associées à la gale bactérienne de
la tomate et des *Capsicum* spp. : situation dans
les îles du Sud Ouest de l'Océan Indien

Soutenue le 14 Décembre 2010

par

HAMZA Abdou Azali

devant la commission d'examen :

Marie-Agnès JACQUES	Chargée de Recherches HDR, INRA	Rapporteur
Claude BRAGARD	Professeur, Université Catholique de Louvain, Belgique	Rapporteur
Jaap JANSE	Directeur de Recherches, NAK, Pays Bas	Examineur
Isabelle ROBENE	Chercheur, CIRAD	Examineur
Bernard REYNAUD	Chercheur HDR, CIRAD	Examineur
Olivier PRUVOST	Chercheur HDR, CIRAD	Directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de l'UMR PVBMT au CIRAD-3P de St Pierre à la Réunion et a été financé par le conseil régional de la Réunion, le fonds social Européen et le CIRAD.

C'est le devoir de chaque homme de rendre au monde au moins autant qu'il en a reçu.

N'essayez pas de devenir un homme qui a du succès. Essayez de devenir un homme qui a de la valeur.

Einstein

Je tiens d'abord à remercier Olivier Pruvost, mon directeur de thèse pour ses conseils précieux, son écoute permanente et surtout sa patience. Je lui suis reconnaissant de la confiance qu'il m'a accordée, des discussions enrichissantes que nous avons eues, de son humour et de sa disponibilité. Quand je suis arrivé dans son équipe, il y a 4 ans, je ne connaissais pas grand chose sur la phytobactériologie et il a fait le pari de me transformer en phytobactériologiste. J'espère qu'il a réussi son pari ! Olivier, à la tête d'une équipe de recherche, est une personne qui, par son enthousiasme, son dynamisme et ses qualités pédagogiques restera dans ma mémoire. Je lui dis encore merci pour tout.

J'adresse également mes vifs remerciements à Isabelle Robène-Soustrade, pour son encadrement sans faille, et cela depuis le stage de perfectionnement que j'ai effectué au 3P en 2005. Pour son premier encadrement, j'ai beaucoup apprécié, d'autant que cela n'a pas été facile tout le temps. Mais elle m'a continuellement soutenu. Qu'elle reçoive toute l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et, pour son dynamisme et ses compétences scientifiques qui nous ont permis de mener à bien cette étude.

Un grand merci à Bernard Reynaud, Directeur du 3P, qui est un des initiateurs de ce projet, et qui m'a accueilli chaleureusement dans son unité de recherche. Je tiens à lui assurer ma reconnaissance et mon amitié. Un grand merci également à tout le personnel du 3P notamment, Océane, Magalie, Sophie, Henri, Chantal, Samuel, Micheline.... avec lesquels j'ai pu passer des nombreux moments

agréables. Je remercie particulièrement les membres de l'équipe de bactériologie, notamment Lionel Gagnevin, Christian Vernière, Isabelle Robène-Soustrade, Philippe Prior et Olivier Pruvost pour leur disponibilité et leur soutien moral et matériel aux moments les plus difficiles jusqu'au bout du bout. Je leur suis reconnaissant à vie.

Je tiens aussi à remercier, Youssoufa Mohamed Ali alias Belou, ex Point focal du PRPV aux Comores de m'avoir encouragé à m'inscrire en thèse et d'avoir pris l'initiative, il y a 5 ans, de contacter Bernard Reynaud pour négocier mon séjour au 3P.

Mes vifs remerciements à tous les membres de mon jury de thèse. Je leur suis reconnaissant de l'honneur et du plaisir qu'ils m'ont fait en acceptant de participer à l'évaluation de ce travail.

Un grand merci également à Claudine Boyer, Karine Vital, Emmanuel Jouen, Annie Laurent, Aurelie, Walter pour leur investissement dans différents essais et leur collaboration technique inestimable. Merci aussi à tous les techniciens pour leur soutien, leur sourire et l'ambiance bon enfant qui a toujours régné au laboratoire. Merci également à Mme Gonthier Marie-Viviane et ses enfants, Monsieur Ilias el Mihidhoir et sa famille, Carine, Antufa et Innocent pour leur soutien et leur amitié.

Je remercie infiniment ma famille, plus particulièrement mon oncle Azali Assoumani, pour l'amour que vous m'avez toujours témoigné ainsi que votre soutien moral et financier tout au long de mes études.

Enfin un grand merci à ma fiancée Mlle Soudjay Soymata Oumie pour sa patience. Je suis vraiment désolé pour cette longue période d'absence.

Ce projet de quatre ans n'aurait pu aboutir sans votre soutien. Que chacun d'entre vous soit ici de tout coeur remercié d'avoir participé de près ou de loin à cette aventure.

A mon père

Table des matières

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1. GENERALITES SUR LA TAXONOMIE BACTERIENNE	8
1.1. L'ESPECE BACTERIENNE	8
1.2. CONCEPT DE PATHOVAR	9
1.3. LES DIFFERENTES APPROCHES TAXONOMIQUES	10
1.4. TAXONOMIE DU GENRE <i>XANTHOMONAS</i>	22
2. LES SOLANEES	33
2.1. LA TOMATE	33
2.2. LE PIMENT	36
3. LA GALE BACTERIENNE DE LA TOMATE ET DES <i>CAPSICUM</i> SPP (PIMENT ET POIVRON)	40
3.1. HISTORIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE	40
3.2. SYMPTOMATOLOGIE	41
3.3. BIOLOGIE ET EPIDEMIOLOGIE	43
3.4. METHODES DE LUTTE	48
4. LES AGENTS PATHOGENES	49
4.1. DESCRIPTION	49
4.2. GAMME D'HOTES	49
4.3. LA SEQUENCE DU GENOME DE <i>XANTHOMONAS EUVESICATORIA</i>	50
5. INFECTION DE LA PLANTE PAR <i>XANTHOMONAS</i>	52
5.1. ENTREE DE LA BACTERIE	52
5.2. INTERACTIONS ENTRE PLANTE ET BACTERIE PATHOGENE	53
5.3. LES DETERMINANTS DU POUVOIR PATHOGENE	54
5.4. RACES ET GENES D'AVIRULENCE CHEZ LES <i>XANTHOMONAS</i> SPP DES SOLANEES	63
6. LE DIAGNOSTIC DE LA GALE BACTERIENNE DES SOLANACEES	67
6.1. RAPPEL SUR LES METHODES DE DIAGNOSTIC DES BACTERIES PHYTOPATHOGENES	67
6.2. LES METHODES SEROLOGIQUES	69
6.3. LES METHODES MOLECULAIRES	71
6.4. LES METHODES DE DIAGNOSTIC DES <i>XANTHOMONAS</i> ASSOCIES A LA GALE BACTERIENNE DES SOLANEES	78
PROBLEMATIQUE-PRESENTATION DU SUJET	81
CHAPITRE II : DIVERSITE GENETIQUE ET PATHOLOGIQUE DES SOUCHES DE <i>XANTHOMONAS</i> RESPONSABLES DE LA GALE BACTERIENNE DES TOMATES ET PIMENTS DANS LE SUD-OUEST DE L'OCEAN INDIEN	83
1. PROBLEMATIQUE	83
2. METHODOLOGIE	84
3. RESULTATS ET DISCUSSION	84
CHAPITRE III : CARACTERISATION GENETIQUE ET BIOLOGIQUE DES <i>XANTHOMONAS</i> ASSOCIES A LA TOMATE ET AU <i>CAPSICUM</i> SPP. (PIMENT, POIVRON) ET LEUR RELATION AVEC LES AUTRES ESPECES DE <i>XANTHOMONAS</i>	103
1. PROBLEMATIQUE	103
2. METHODOLOGIE	104
3. RESULTATS ET DISCUSSION	104

CHAPITRE IV : ELABORATION D'UN PROTOCOLE D'IDENTIFICATION PAR PCR DES ESPECES RESPONSABLES DE LA GALE BACTERIENNE DES SOLANEES A GRAINES	174
1. PROBLEMATIQUE	174
2. METHODOLOGIE	176
2.1. CULTURES BACTERIENNES ET EXTRACTION D'ADN	176
2.2. AFLP	176
2.3. RECUPERATION DES FRAGMENTS D'INTERETS	178
2.4. PCR	179
3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION	188
3.1. EVALUATION DE DIFFERENTES AMORCES SUR UNE COLLECTION DE SOUCHES ASSOCIEES A LA GALE BACTERIENNE DE LA TOMATE	188
3.2. RECHERCHE DE MARQUEURS SPECIFIQUES PAR LA TECHNIQUE AFLP	191
4. CONCLUSION	209
4.1. UN NOUVEAU PROTOCOLE DE DIAGNOSTIC DE LA GALE BACTERIENNE	209
4.2. QUELLE SPECIFICITE?	211
4.3. EVALUATION DE LA METHODE AFLP POUR LA SELECTION DE MARQUEURS SPECIFIQUES	212
CHAPITRE V : DISCUSSION GENERALE	215
1. CLASSIFICATION ET DIVERSITE DES <i>XANTHOMONAS</i> PATHOGENES DES SOLANEES	215
2. UN EVENEMENT DE RECOMBINAISON CHEZ CERTAINES SOUCHES DE <i>XANTHOMONAS EUVESICATORIA</i>	219
3. DE LA SIMILITUDE GENETIQUE A LA SIMILITUDE BIOLOGIQUE	222
4. AMELIORATION DE L'OUTIL PCR ET MISE AU POINT D'UN OUTIL DE DIAGNOSTIC POUR LA DETECTION DES <i>XANTHOMONAS</i> PATHOGENES DES SOLANEES DANS LES SEMENCES.	223
ANNEXES	225
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	230

Index des figures et tableaux

Figure 1.2 : schéma illustrant le principe de l'AFLP avec <i>MspI</i> et <i>SacI</i>	15
Figure 1.3 : analyse d'acides nucléiques par puces à ADN	17
Figure 1.4 : classification actuelle du genre <i>Xanthomonas</i>	25
Tableau 1.1 : reclassification de certains pathovars du genre <i>Xanthomonas</i> qui n'étaient pas, autrefois, attribués à une espèce et qui étaient placés par défaut dans l'espèce <i>X. campestris</i> (Parkinson <i>et al.</i> , 2009)	26
Figure 1.5 : arbre phylogénétique des différents groupes phénotypiques de <i>Xanthomonas</i> spp. associés aux Solanées à partir des séquences de l'ADNr 16S et de l'IGS (Jones <i>et al.</i> , 2000).	30
Figure 1.6 : arbre phylogénétique du genre <i>Xanthomonas</i> à partir des séquences de <i>gyrB</i> (Parkinson <i>et al.</i> , 2009)	32
Tableau 1.2a : production mondiale de tomate en 2008 (http://faostat.fao.org/).....	34
Tableau 1.2b : production de tomate dans les îles de l'Océan Indien en 2008 (http://faostat.fao.org/)	34
Tableau 1.3a : production mondiale de piments doux et épicé en 2008 (http:// faostat.fao.org/).....	37
Tableau 1.3b : production de piments doux et épicé dans les îles de l'Océan Indien en 2008 (http://faostat.fao.org/).....	38
Tableau 1.3c : production mondiale de piments forts, piment doux frais en 2008 (http:// faostat.fao.org/).....	38
Tableau 1.3d : production de piments forts, piments doux frais dans les îles de l'Océan Indien en 2008 (http://faostat.fao.org/).....	38
Figure 1.7 : répartition géographique des <i>Xanthomonas</i> spp. associés aux Solanées à graines (modifié d'après (Jones <i>et al.</i> , 1998) et (Obradovic <i>et al.</i> , 2008)).....	40
Figure 1.8a : symptômes sur feuilles et fruits de tomates (http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/french/tomatoes/diseases-and-disorders/bacterial-spot.html)	41
Figure 1.8b : symptômes sur tige de tomate (http://www.forestryimages.org)	41
Figure 1.9a : symptômes sur feuilles de piment (http://www.forestryimages.org).....	42
Figure 1.9b : symptômes sur fruits de poivron (http://www.forestryimages.org)	42
Figure 1.10 : cycle épidémiologique de la gale bactérienne	47
Figure 1.11 : colonies de <i>X. euvesicatoria</i>	49
Tableau 1.4 : comparaison générale des génomes de 10 espèces de <i>Xanthomonas</i> séquencées (Blom <i>et al.</i> , 2009)	52
Figure 1.12 : représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) chez les bactéries phytopathogènes	58
Tableau 1.5 : caractéristiques des effecteurs de type III de <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (souche 85-10) (Thieme <i>et al.</i> , 2005)	59
Figure 1.13 : mode d'action de AvrBs3 et XopD (Kay & Bonas, 2009)	62
Tableau 1.6 : réactions des différentes races de <i>Xanthomonas</i> spp. des Solanées avec les gènes de résistance de la tomate (Stall <i>et al.</i> , 2009)	64
Tableau 1.7 : réactions des différentes races de <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> avec les gènes de résistance des piments (Stall <i>et al.</i> , 2009).....	65
Tableau 1.8 : sources de résistances sur tomate et piment et effecteurs bactériens correspondants.....	66
Figure 1.14 : schéma OEPP d'utilisation des tests pour le diagnostic de <i>X. vesicatoria</i> dans les semences de tomate	79
Tableau 4.1 : adaptateurs et amorces utilisés dans cette étude.	177

Tableau 4.2a : souches bactériennes associées la gale bactérienne des Solanées à graines utilisées dans cette étude, et réponses aux différents tests PCR effectués.	183
Tableau 4.2b : souches bactériennes non cibles utilisées dans cette étude, et réponses aux différents tests PCR effectués.....	185
Tableau 4.3 : PCR <i>X. perforans</i> et <i>X. gardneri</i> : essais de différentes températures d'hybridation avec les différentes paires d'amorces utilisées.....	187
Figure 4.1a : PCR réalisée avec les amorces BSX1/BSX2 (Cuppels) sur différentes espèces associées à la gale bactérienne.....	188
Figure 4.1b : PCR réalisée avec les amorces Bs-XvF et Bs-XvR (Koenraad) sur différentes souches de <i>X. vesicatoria</i>	189
Figure 4.1c : PCR réalisée avec les amorces Bs-XgF et Bs-XgR (Koenraad) sur l'ensemble des souches de <i>X. gardneri</i>	189
Figure 4.1d : PCR réalisée avec les amorces Bs-XgF et Bs-XgR (Koenraad) sur différentes souches de <i>X. perforans</i>	190
Figure 4.2 : exemple de marqueurs spécifiques obtenus sur gel de polyacrylamide après AFLP en conditions <i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	192
Tableau 4.4 : amplification des marqueurs communs à <i>X. perforans</i> et <i>X. euvesicatoria</i> en conditions AFLP 4 bases sélectives (<i>SacI</i> +CN <i>MspI</i> +NN)	194
Tableau 4.5 : sélection des conditions AFLP 4-bases sélectives pour l'amplification des marqueurs candidats sur plusieurs souches de <i>X. perforans</i> et <i>X. euvesicatoria</i>	195
Tableau 4.6 : comparaison entre fragments AFLP prédits <i>in silico</i> (logiciel <i>In silico</i> AFLP-PCR amplification) et fragments récupérés après migration des produits AFLP sur gel de polyacrylamide.	198
Tableau 4.7 : nature des fragments d'ADN récupérés sur gel de polyacrylamide pour <i>X. perforans</i>	200
Figure 4.3 : amplification de l'ensemble des souches de <i>X. perforans</i> à l'aide des amorces 109U/267L20	202
Tableau 4.8 : nature des fragments d'ADN récupérés sur gel de polyacrylamide pour <i>X. gardneri</i>	205
Figure 4.4 : région intergénique ciblée dans la PCR spécifique développée pour <i>X. gardneri</i>	206
Figure 4.6 : amplification de l'ensemble des souches de <i>X. gardneri</i> à l'aide des amorces 7383-1U/ 2299L. ..	207
Figure 4.5 : désignation de différentes amorces sur l'alignement de séquences de <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> (306) et <i>X. gardneri</i> (souches JQ725 et ICMP 7383).	208
Figure 4.7 : alignement des différentes séquences de la zone intergénique obtenues pour 306 (<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>), JQ725, NCPPB881 et ICMP7383 (<i>X. gardneri</i>), CFBP4188 (<i>X. cynarae</i>) et <i>X. hortorum</i> (CFBP4925)..	208
Figure 4.8 : protocoles PCR pour détecter les <i>Xanthomonas</i> spp. responsables de la gale bactérienne des Solanées à graines.....	210

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur la taxonomie bactérienne

La taxonomie ou (taxonimie) est la science qui permet de classer les organismes en groupes d'affinité ou taxons. Elle forme avec la nomenclature les deux disciplines de la systématique, science ayant pour but de classer rationnellement les êtres vivants et de leur attribuer un nom.

1.1. L'espèce bactérienne

Elle est le maillon principal de la classification. La notion d'espèce biologique telle qu'elle a été définie dans la taxonomie des eucaryotes n'est pas applicable chez les bactéries. En bactériologie, une espèce est définie comme un ensemble de souches ayant en commun de nombreuses propriétés stables et qui se différencie des autres groupes de souches de façon marquée. Ainsi, l'espèce bactérienne est constituée par sa souche type et l'ensemble des souches qui sont morphologiquement, biochimiquement et génétiquement proche de la souche type. La notion d'espèce chez les bactéries n'est pas figée, elle varie en fonction des critères choisis pour apprécier la similitude des souches (caractères phénotypiques, génétiques, sérologiques...). Le choix des critères à prendre en considération dans la définition de l'espèce bactérienne est problématique, car ces critères ont varié avec le temps et l'évolution des techniques.

Ainsi, deux comités désignés en 1987 par l'International Committee on Systematic Bacteriology (ICSB) (Wayne *et al.*, 1987) et en 2002 par l'International Committee on Systematic of Prokaryotes (ICSP) (Stackebrandt *et al.*, 2002), ont eu la lourde tâche de définir des critères et de proposer une définition de l'espèce.

Selon le comité de Wayne, une espèce est définie génétiquement (genomospecies) comme l'ensemble des souches dont les ADN totaux (chromosome + plasmides) s'hybrident à plus de 70% avec une valeur $\Delta T_{m(e)}$ inférieure ou égale à 5°C (Le ΔT_m ou divergence, correspond à la différence entre le T_m –thermal elution midpoint, température de demi dénaturation de l'hybride- de l'homoduplex et le T_m de l'hétéroduplex). A l'inverse du $\Delta T_{m(e)}$, les valeurs d'hybridation peuvent varier sensiblement en fonction des conditions opératoires (technique

et stringence utilisées). Un pourcentage d'hybridation d'au moins 70 correspond à une identité de séquence d'au moins 96% (Stackebrandt *et al.*, 2002). La mesure de $\Delta T_{m(e)}$ permet d'apprécier la stabilité thermique des hybrides. Il existe une corrélation entre la stabilité thermique et le pourcentage de bases non appariées (<http://www.bacteriologie.net/generale/systematique.html>). Une étude des caractères phénotypiques peut compléter les données génomiques.

En raison de la lourdeur opératoire de la technique des hybridations ADN-ADN et le caractère innovateur des méthodes de biologie moléculaire, le comité de Stackebrandt suggère de garder les hybridations ADN-ADN comme méthode de référence et encourage l'utilisation d'autres techniques dont les résultats sont comparables à ceux des hybridations ADN-ADN (AFLP, PFGE, séquençage complet du génome, séquençage des gènes de ménage...). Il propose aussi le séquençage systématique du gène *rrs* (ARNr 16S) de la souche type de l'espèce type d'un nouveau genre et de déterminer sa composition en G+C%, d'utiliser le maximum de souches dans la description d'une nouvelle espèce et enfin de s'assurer de la fiabilité des caractères phénotypiques et génomiques dont on dispose, avant d'attribuer un nom à une espèce.

1.2. Concept de pathovar

La classification en pathovar n'a aucune valeur taxonomique. Ce concept de pathovar définit des souches bactériennes appartenant au même taxon mais qui diffèrent par leur gamme d'hôtes et/ou provoquent des symptômes différents sur un même hôte (Young *et al.*, 1992). C'est un classement infraspécifique permettant de distinguer différentes souches appartenant à la même espèce ou sous-espèce en se basant sur des critères biologiques. Ce classement est reconnu par la communauté scientifique et permet l'établissement des règles régissant les échanges internationaux des végétaux. Le nom du pathovar est cité en 3^e ou 4^e position après le nom binomial (genre espèce).

1.3. Les différentes approches taxonomiques

a. L'approche phénotypique

Depuis la découverte des bactéries en 1676 par le biologiste néerlandais Antony van Leeuwenhoek (Figure 1.1), jusqu'à la fin du XVII^{ème} siècle, aucune classification n'a été établie.



Figure 1.1 : portrait de Antony van Leeuwenhoek (<http://www.vanleeuwenhoek.com/>)

Ce n'est qu'autour du XVIII^{ème} siècle que la taxonomie bactérienne a été initiée par le naturaliste danois Otto Friedrich Müller qui, à partir de l'observation de la morphologie de certaines bactéries, a créé deux genres : *Monas* et *Vibrio*. Au début du XIX^e siècle, se basant sur la forme et la mobilité des bactéries, le savant allemand Ehrenberg proposa un troisième genre de bactérie, les spirochètes, de forme hélicoïdale. En 1872, en accord avec les premiers taxonomistes, Cohn proposa une première classification regroupant les bactéries en six genres suivant leur forme et depuis cette année jusqu'au début des années 1960, toute la taxonomie bactérienne s'est basée sur une classification phénétique. Les caractères étudiés dans cette classification sont d'ordre morphologique. Cependant, cette classification ne reflète qu'un nombre limité d'informations et les critères considérés sont subjectifs et peuvent varier en fonction des conditions environnementales. Une approche phénotypique particulière est la chimiotaxonomie qui est basée sur l'analyse des constituants cellulaires tels que les peptidoglycanes, les quinones, les lipides polaires et les acides mycoliques. Elle est couramment utilisée pour la définition d'espèce.

Par ailleurs, la taxonomie numérique est une autre approche phénotypique qui a révolutionné la taxonomie bactérienne par le développement de la taxonomie assistée par ordinateur. Initiée en 1753 par le botaniste français Adanson et appliquée ultérieurement sur les bactéries, la taxonomie numérique ou adansonienne consiste à évaluer la similitude entre de nombreuses souches en comparant de nombreuses caractéristiques (morphologique, biochimique, physiologique) tout en accordant à chacune d'elles le même poids. La structuration taxonomique se fait par l'intermédiaire de programme d'agrégation (cluster analysis), pouvant évaluer la ressemblance entre les souches par le calcul d'un indice numérique (coefficient de simple appariement, coefficient de Jaccard) (Kelman, 1990). Malgré le nombre important de caractères étudiés, cette technique n'évalue que 5 à 20% du potentiel génétique d'une bactérie.

b. L'approche moléculaire

Détermination du G+C pour cent

Le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN est variable d'un génome à l'autre, cependant il est relativement constant pour les individus d'une même espèce. Ce contenu en base de l'ADN est exprimé par le pourcentage G+C qui est ainsi défini :

$$G+C = (G+C) \times 100 / (A+T+G+C),$$

Chaque base étant exprimée en concentration molaire.

Généralement, la détermination du pourcentage G+C s'effectue par dénaturation thermique de l'ADN, une technique délicate, peu reproductible et nécessitant des grandes quantités d'ADN. En 2006, Fournier *et al.* ont montré que le gène de ménage *ftsY* codant pour une GTPase, a une valeur G+C% comparable à celle du génome bactérien (Fournier *et al.*, 2006). Le gène *ftsY* est présent en un seul exemplaire et ne semble pas pouvoir se transmettre horizontalement. La technique de détermination de la valeur G+C% du gène *ftsY* est rapide et reproductible. Elle utilise peu d'ADN et ne requiert pas un équipement particulier.

Le contenu G+C% des procaryotes varie entre 25% et 75% (Vandamme *et al.*, 1996). Il est admis que des bactéries dont les valeurs G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à la même espèce et que des bactéries ayant des valeurs de G+C% qui diffèrent de plus de 10% ne devraient pas appartenir à un même genre. Cependant des valeurs de G+C% identiques n'impliquent pas forcément que les bactéries sont proches.

Hybridation d'acides nucléiques

Cette technique a été rendue possible grâce à la découverte du phénomène de renaturation de l'ADN (Marmur & Doty, 1962). En effet, le chauffage progressif d'une molécule d'ADN entraîne la rupture des liaisons hydrogènes reliant chaque paire de bases et provoque ainsi la séparation des deux brins de la double hélice. La température de dénaturation est proportionnelle à la teneur en G+C du génome étudié. Un refroidissement lent de la solution d'ADN favorise la réassociation des deux brins de l'ADN monocaténaire rétablissant ainsi la structure en double hélice. En revanche, si le refroidissement est brutal, la structure monocaténaire est conservée.

En bactériologie, les hybridations ADN-ADN sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. Différentes méthodes sont utilisées pour mesurer le taux d'homologie chez les hybrides. Les plus courants sont la méthode à l'hydroxyapatite (Brenner *et al.*, 1969), la méthode de la nucléase S1 (Crosa *et al.*, 1973) et la méthode de renaturation optique (De Ley *et al.*, 1970). Pour les deux premières méthodes, l'un des ADN du mélange est généralement marqué par un isotope radioactif. La troisième méthode ne nécessite pas de marquage, mais son inconvénient est qu'elle ne permet pas le calcul du ΔT_m et pour des valeurs de réassociations inférieures à 30%, la méthode n'a aucune signification taxonomique (Grimont, 1988).

En général, la température de dénaturation (T_m) est assez élevée et la température optimale de renaturation (T_{or}) est de 22-26°C en dessous du T_m (Vandamme *et al.*, 1996). Lors de la renaturation, deux types de duplex peuvent se former : un duplex homologue formé par la réassociation des deux monobrans d'ADN provenant de la même bactérie et un duplex hétérologue ou hybride formé d'une chaîne de nucléotides d'un des ADN et d'une chaîne de l'autre ADN. Les réassortiments des hybrides seront d'autant plus complets que les brins d'ADN seront complémentaires. En d'autres termes plus les bactéries seront génétiquement semblables, plus les hybrides formés seront solides. La mesure de la stabilité thermique des duplex hétérologues, par l'étude de leur cinétique de dénaturation lorsque la température est augmentée au dessus du T_{or} , permet d'apprécier leur spécificité. On mesure ainsi le $T_{m(e)}$ (Température médiane d'élution ou thermal elution midpoint) qui est la température de demi-dénaturation de l'hybride c'est-à-dire la température nécessaire pour éluer 50% de la radioactivité de l'hybride. On appelle $\Delta T_{m(e)}$, la différence entre les $T_{m(e)}$ des duplex

homologues et hétérologues. Elle mesure précisément le degré d'homologie des duplex. Il existe une corrélation entre $\Delta T_{m(e)}$ et le pourcentage de bases non appariées. Il est admis qu'un $\Delta T_{m(e)}$ de 1,6°C correspond à 1% de paires de bases non appariées (<http://www.bacteriologie.net/generale/systematique.html>).

Comme nous l'avons précisé plus haut, les comités de taxonomie recommandent l'utilisation des hybridations ADN/ADN afin de définir une espèce bactérienne ou encore « genomospecies ». A l'heure actuelle, cette technique est la seule technique de référence utilisée pour la définition de l'espèce bactérienne. Cependant cette technique est lourde et longue à mettre en œuvre et nécessite de très grandes quantités d'ADN. Cette lourdeur opérationnelle limite les comparaisons d'un grand nombre de souches deux à deux, ce qui ne permet pas de prendre en compte la diversité d'un groupe lors de son positionnement taxonomique. Une approche polyphasique de la définition de l'espèce, par l'utilisation concomitante de différentes techniques de typage et le développement de techniques visant à compléter et à terme à remplacer les hybridations ADN/ADN, est largement encouragée par le comité de taxonomie de 2002 (Stackebrandt *et al.*, 2002).

c. Outils moléculaires modernes et taxonomie

De nos jours, les études phylogénétiques sont basées sur l'utilisation de marqueurs moléculaires et des séquences de gènes. La première classification des bactéries, basée sur des marqueurs moléculaires, a été proposée par Woese et ses collaborateurs en 1970. En effet, en se basant sur l'étude de l'ARN 16S, ces auteurs ont suggéré l'existence de deux groupes de procaryotes : les eubactéries et les archéobactéries (Woese & Fox, 1977). Pour illustrer leurs idées, les auteurs ont proposé l'arbre phylogénétique universel dans lequel ils suggérèrent une division du monde vivant en trois super-règnes : les archaebactéries, les urkaryotes (Eucaryotes) et les eubactéries. Sur la base de ces travaux sur les ARNs ribosomiaux, les auteurs proposèrent une première reconstruction phylogénétique des procaryotes (Woese, 1987). Depuis, le séquençage de l'ARNr 16S est devenu un des principaux outils de la taxonomie bactérienne et il est même recommandé pour toute description d'une nouvelle espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002). D'autre part plusieurs techniques sont utilisées pour analyser le polymorphisme des molécules d'ADN.

Méthodes de génotypage

REP-PCR (repetitive sequence based-PCR).

Cette technique consiste à amplifier par PCR des régions d'ADN génomique bactérien situées entre des séquences hautement répétées et dispersées dans le génome de la plupart des genres bactériens (Versalovic *et al.*, 1991). Ces séquences sont bien conservées et peuvent servir d'amorces pour amplifier les régions ciblées de l'ADN génomique bactérien (Versalovic *et al.*, 1998). Dans cette méthode, quatre types de séquences répétées ont été utilisées. Il s'agit de séquences de type REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), XRIC (Xanthomonas Repetitive Intergenic Consensus) et les éléments de type BOX.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Développée par Vos *et al.* en 1995, l'AFLP est largement utilisée dans plusieurs domaines scientifiques, entre autres l'étude de la variabilité génétique et la cartographie génétique (Vos *et al.*, 1995). Le principe de cette technique repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir de l'ADN génomique (Figure 1.2). Elle exploite à la fois le polymorphisme de site de restriction et le polymorphisme généré par les réactions d'amplification par PCR (Roumagnac *et al.*, 2004). Cette technique permet de générer un grand nombre de marqueurs polymorphes, amplifiés au hasard dans le génome et permet ainsi d'avoir une information globale sur le génome étudié. C'est une des techniques de génotypage les plus performantes pour estimer la diversité existant au sein d'espèces et de pathovars chez les *Xanthomonas* (Janse *et al.*, 2001; Loreti *et al.*, 2001; Rademaker *et al.*, 2000; Restrepo *et al.*, 1999). Le principal écueil de cette technique est qu'elle est peu transférable d'un laboratoire à l'autre (Fry *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2005).

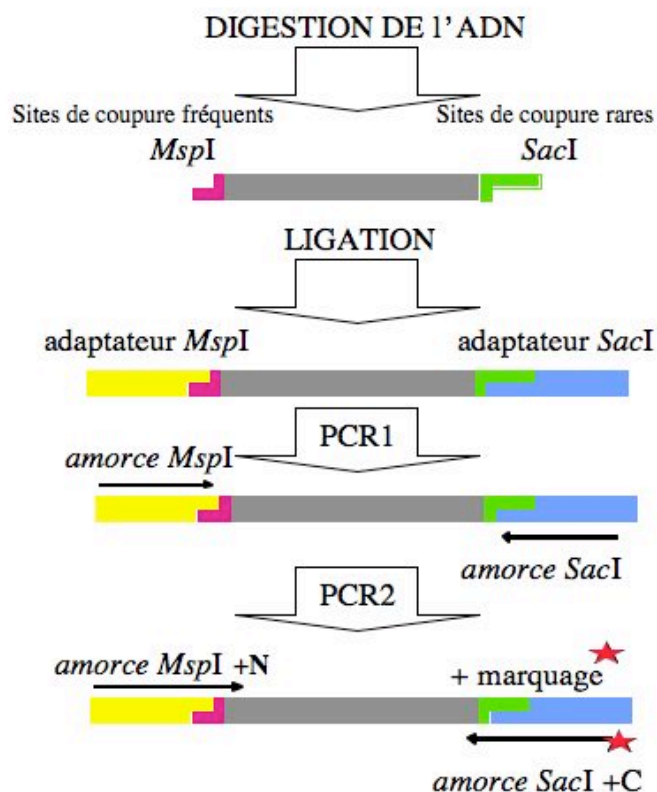


Figure 1.2 : schéma illustrant le principe de l'AFLP avec *MspI* et *SacI*

Après digestion de l'ADN par deux enzymes de restriction *MspI* et *SacI*, des adaptateurs *MspI* et *SacI* sont ligués sur les fragments digérés. Une première amplification non sélective est réalisée à l'aide des amorces *MspI* et *SacI* puis une deuxième amplification, cette fois-ci sélective est réalisée à l'aide de l'amorce *MspI* non marquée à laquelle on rajoute une base sélective A ou C ou T ou G et de l'amorce *SacI* + C marquée avec un fluorophore. L'analyse des profils AFLP est réalisée sur un séquenceur qui détecte les signaux fluorescents.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

C'est une technique qui suscite actuellement beaucoup d'intérêt. Elle repose sur la grande variabilité de certaines positions des régions codantes et non codantes du génome, révélée par les actions de séquençage intensif et qui donne lieu à ces polymorphismes sur un seul nucléotide. Le site qui héberge ce polymorphisme est désigné par le terme « Single Nucléotide Polymorphism » (Schork *et al.*, 2000). Deux types de SNPs peuvent se produire dans les gènes codant pour la synthèse des protéines (Gut, 2001; Kimura, 1983; Schork *et al.*, 2000), les SNPs non synonymes et les SNPs synonymes. Seuls ces derniers, en raison de leur effet neutre, peuvent être utilisés comme marqueurs dans des études populationnelles et

d'évolution des bactéries notamment chez des souches clonales (Gut, 2001; Gutacker *et al.*, 2002; Kimura, 1983; Schork *et al.*, 2000) et se prêtent à une analyse à haut débit. La technique SNP est déjà utilisée pour l'étude des relations phylogénétiques et de suivi épidémiologique de *Mycobacterium tuberculosis* (Filliol *et al.*, 2006; Gutacker *et al.*, 2002).

Puces à ADN

Mise au point en 1995 par Schena *et al.*, la technique des puces à ADN repose sur la miniaturisation de l'hybridation permettant l'identification simultanée des milliers de molécules différentes d'acides nucléiques d'un micro-organisme (Schena *et al.*, 1995). En effet, un échantillon (ADN ou ARN) marqué à l'aide d'un fluorochrome ou un radioélément est incubé avec la puce composée de plusieurs milliers de sondes (fragments d'ADN ou oligonucléotides de séquence connue) déposées sur un support en général en nylon ou verre (Lopez *et al.*, 2006); (Lopez *et al.*, 2009). Après lavage du matériel fixé de manière non spécifique, les signaux produits sont traités par un ordinateur. On obtient ainsi des profils différents d'hybridation en fonction du pourcentage d'identité avec la sonde (Boulouis *et al.*, 2001; Glaser, 2005).

La technique des puces à ADN est une technique innovante pour la détection, l'identification et le typage des bactéries (Figure 1.3). Elle est utilisée dans le domaine de la recherche afin d'étudier la diversité et l'évolution du monde bactérien, la caractérisation des communautés bactériennes en général plurispécifiques et dans la recherche des gènes de résistance aux antibiotiques (Glaser, 2005). Aussi, cette technique est utilisée pour étudier la diversité génétique entre les souches d'une même espèce ainsi que les relations phylogénétiques entre deux espèces proches (Kato-Maeda *et al.*, 2001). Pour cette application, il est nécessaire de disposer du génome complet d'une souche, afin de désigner des sondes couvrant l'ensemble des CDS, qui seront fixés sur la puce à ADN. Le génome d'autres souches pourra alors être comparé à ce génome référent par hybridation sur la puce (présence ou absence de gènes).

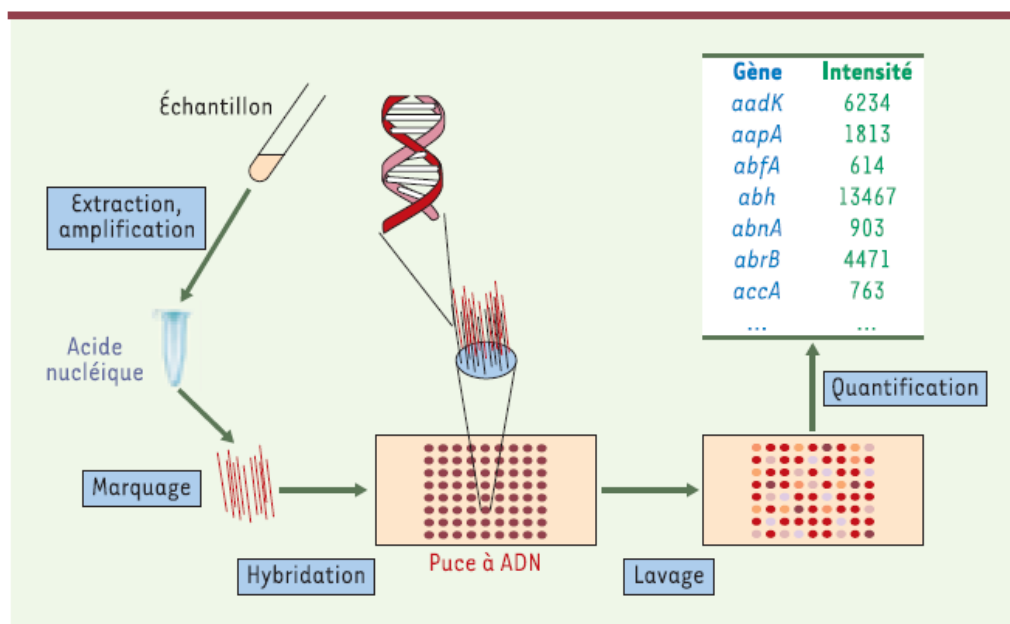


Figure 1.3 : analyse d'acides nucléiques par puces à ADN

L'ADN ou l'ARN est purifié et éventuellement amplifié à partir d'un échantillon biologique. Il est ensuite marqué à l'aide d'un fluorophore et mis en contact avec les sondes portées par la puce. Ainsi, les acides nucléiques marqués vont s'apparier avec les sondes fixées sur le support. L'élimination des acides nucléiques marqués fixés de façon non spécifique est réalisée par lavage. Enfin, la quantification de la fluorescence au niveau de chaque dépôt de sonde est effectuée à l'aide de tubes photomultiplicateurs ou d'une caméra CCD (Charge-coupled device). Un traitement informatique des valeurs obtenues pour chaque sonde permet la caractérisation de l'échantillon.

Méthodes de séquençage

Séquençage du gène ARNr 16S

Présents dans toutes les bactéries, avec une structure bien conservée, les gènes de l'ARNr constituent un outil de choix pour l'étude des relations phylogénétiques entre différents organismes (Vandamme *et al.*, 1996) et ont été largement utilisés en classification phylogénétique (Woese, 1987). Le gène de l'ARN 16S a comme avantage d'être facilement séquençable, d'avoir une séquence suffisamment informative et d'être constitué de domaines hautement conservés entourant des domaines variables (Woese, 1987). Actuellement, avec les avancées technologiques en terme de séquençage et l'existence d'une base de données accessible via internet, des séquences de nombreuses espèces, cette technique est utilisée de façon routinière en taxonomie et elle est recommandée pour la souche type d'une nouvelle espèce (Stackebrandt *et al.*, 2002). Il est admis qu'en dessous de 97% d'homologie deux bactéries ne peuvent appartenir à la même espèce. Toutefois, la présence de plusieurs copies

de l'ADNr 16S au sein d'un génome peut handicaper l'établissement de la phylogénie dans certains groupes bactériens (Marchandin *et al.*, 2003). L'hétérogénéité de ces copies peut entraîner une surestimation des espèces bactériennes d'une communauté (Roudière *et al.*, 2007)

MLST (Multi Locus Sequence Typing)

C'est une méthode basée sur l'étude des séquences de fragments de plusieurs gènes de ménage (housekeeping genes), ou de gènes dit informationnels, généralement 7 à 10 (Maiden *et al.*, 1998). Ce sont des gènes indispensables à la vie de tous les types de cellules et dont la vitesse d'évolution est modérée pour les premiers, et faible pour les seconds. Chaque fragment présente des variations de séquence d'une souche à l'autre. Les différentes séquences possibles de chaque fragment sont désignées par un allèle. La combinaison des allèles trouvés pour chacun des « n » loci des gènes de ménages définit le profil allélique ou « sequence type » (ST) qui est caractéristique de chaque souche. Le principal objectif de cette technique est l'identification des ST pour le typage des bactéries à des fins d'études épidémiologiques. Cette méthode est déjà proposée comme méthode de référence au niveau européen par le groupe EWGLI (European Working Group for Legionella Infection), dans le typage des souches de *Legionella pneumophila* à des fins d'études épidémiologiques (Gaia *et al.*, 2005). Elle a permis également l'estimation des niveaux de déséquilibres de liaisons alléliques et l'importance relative des transferts horizontaux et des mutations chez des nombreuses espèces bactériennes (Achtman *et al.*, 1999; Falush *et al.*, 2001; Feil *et al.*, 2001; Feil & Spratt, 2001; Maiden *et al.*, 1998; Suerbaum *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2001).

MLSA (Multilocus Sequence Analysis)

La méthode MLSA est basée sur l'analyse de polymorphisme des gènes de ménage avec comme principal objectif, la reconstruction phylogénétique de l'histoire des organismes (Gevers *et al.*, 2005). En effet, des fragments d'un ou plusieurs gènes de ménages sont séquencés sur un nombre important de souches. Les séquences sont ensuite alignées à l'aide des logiciels spéciaux, comparées et servent à la construction d'arbres phylogénétiques. Cependant la phylogénie basée sur un seul gène peut présenter une résolution limitée (Delsuc *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'analyse combinée de plusieurs gènes permet de s'affranchir des cas d'histoire évolutive particulière (une pression de sélection spécifique par exemple) ou de recombinaisons. Cette approche devient de plus en plus populaire dans les études sur l'évolution et la phylogénie des plus importantes bactéries pathogènes de l'homme et des

plantes (Ah-You *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2003; Naser *et al.*, 2005; Richter *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008). Le principal avantage de cette technique est sa haute reproductibilité permettant ainsi un échange de données entre laboratoires. Aussi les résultats peuvent être centralisés dans une base de données internationale disponible via internet.

Le séquençage complet de génomes

L'idéal, pour déterminer les relations entre les organismes, serait la comparaison de séquences nucléotidiques complètes de génomes. Le séquençage du génome entier est la méthode la plus sûre pour mettre en évidence tout le polymorphisme existant au sein des génomes des organismes étudiés. En revanche son coût jusque-là exorbitant limitait son application dans des études impliquant un grand nombre de souches. Par contre les nouvelles technologies de séquençage sont beaucoup plus puissantes et permettent d'envisager à court terme des analyses méta génomiques en un temps réduit et à coût raisonnable.

Le premier séquençage complet d'un génome bactérien a été réalisé en 1995 par le groupe de Craig Venter (TIGR). Depuis, avec l'extension de techniques rapides de séquençage, le nombre de génomes bactériens entièrement séquencés ne cesse d'augmenter. L'espèce *Xylella fastidiosa* fut le premier agent phytopathogène à être séquencé (Simpson *et al.*, 2000). Actuellement, 11 souches du genre *Xanthomonas* représentant 6 espèces et 7 pathovars dont *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. euvesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *armoraciae*, *X. vasicola* pv. *musacearum*, *X. albilineans* *X. vasculorum*, *X. citri* pv. *citri* sont séquencées (Meyer & Bogdanove, 2009; Pieretti *et al.*, 2009). D'autres souches appartenant aux espèces *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. citri* pv. *citri* et *X. axonopodis* pv. *phaseoli* mais aussi *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* sont en cours de séquençage. (<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/207778.html>) ; <http://vision.biotech.ufl.edu/mycap/jsp/project/projects.jsp>, Projet GENOSCOPE 2009/2010).

L'ANI (pour average nucleotide identity) entre deux génomes est un indice qui permet d'évaluer la distance génétique entre deux génomes (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Cette technique est applicable sur les souches dont le génome a été séquencé. En effet, l'un des génomes à étudier (query) est découpé en plusieurs fragments puis à l'aide d'un logiciel particulier, on effectue un blast sur l'autre génome. L'ANI est considéré comme étant la

moyenne des fragments ayant une homologie de séquence de plus de 30% pour au moins 70% de leur taille (Goris *et al.*, 2007). Une valeur d'ANI de 95% correspond à une valeur d'hybridation ADN-ADN de 70% (Goris *et al.*, 2007; Konstantinidis & Tiedje, 2005).

d. Méthodes de reconstruction phylogénétique

Principes de base de la cladistique

Initiée par Willi Hennig (1913-1976), la systématique cladistique a connu un essor considérable au cours de ces trente dernières années. Elle est basée sur la recherche des parentés évolutives entre espèces en les rassemblant en groupe monophylétique c'est-à-dire un groupe constitué par un ancêtre commun et la totalité de ses descendants.

Dans cette approche, la phylogénie d'un taxon est reconstruite à l'aide d'une analyse visant à discriminer au sein d'un caractère, l'état primitif (= plésiomorphe) de l'état dérivé (= apomorphe). Seuls les états dérivés partagés entre les taxons étudiés (= synapomorphies), permettent d'identifier les parentés entre tel et tel taxon. Les synapomorphies sont attribués à un legs d'une espèce ancestrale propre aux taxons qui les possèdent.

Méthode de parcimonie

La méthode de parcimonie postule que le nombre de changement d'état de caractère entre les taxons étudiés soit le minimum possible. L'arbre phylogénétique retenu doit être le plus court possible. En d'autres termes, sa conception doit impliquer le minimum d'événements évolutifs. L'analyse par la méthode de parcimonie se déroule en 4 étapes :

- Identifier les sites informatifs ;
- Dédire toutes les topologies d'arbres possibles pour les séquences étudiées ;
- Calculer le nombre minimum de substitutions pour chaque site informatif ;
- Calculer la somme de changements pour chaque arbre ;
- Choisir la topologie de l'arbre qui nécessite le moins de changements.

Comparée aux méthodes de distance, cette méthode s'avère très lente pour évaluer les arbres.

Méthodes des distances (phénétique)

A l'opposé de la cladistique, les méthodes phénétiques reposent sur le postulat de base qu'il y a corrélation entre le degré de ressemblance et le degré de parenté des taxons étudiés. Il s'agit ici, d'une ressemblance globale établie à partir du maximum d'observations disponibles constituant un ensemble de nature homogène (exemple : ensemble de fréquences alléliques, séquence nucléotidique d'un même gène...). Ces méthodes tentent de quantifier la ressemblance entre les organismes en calculant un indice de similitude globale entre deux taxons. Cet indice exprimé en pourcentage est assimilé à la distance génétique entre les deux taxons. Dans le cas des séquences alignées, cette distance est le nombre de nucléotides différents entre les deux espèces, divisé par le nombre de sites examinés (Lecointre *et al.*, 2001). L'analyse des séquences par cette méthode se fait en deux étapes principales :

- Calcul des distances
- Construction d'arbre phylogénétique

La matrice de caractères (alignement) doit être transformée en matrice de distance en comparant les lignes de la matrice (séquences) deux à deux. La nature phylogénétique de ces méthodes n'apparaît qu'à la condition d'y introduire des hypothèses évolutives extrinsèques (Darlu & Tassy, 1993). Ainsi, la comparaison des lignes de la matrice se fait sur la base d'un modèle évolutif (Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Kimura) qui décrit de manière statistique le processus évolutif agissant sur la séquence. Une fois les distances calculées, il existe plusieurs méthodes permettant de construire l'arbre phylogénétique à partir de la matrice des distances. On peut citer entre autres, la méthode Neighbor-joining qui est la méthode la plus préconisée actuellement. Les méthodes de distances sont rapides et permettent l'analyse de grandes bases de données tout en testant un grand nombre d'hypothèses alternatives. Aussi, elles permettent d'intégrer des modèles de changements évolutifs non intégrables dans d'autres méthodes.

Maximum de vraisemblance

Les méthodes de maximum de vraisemblance permettent aussi l'utilisation d'un modèle évolutif. Elles sont basées également sur des études statistiques. En effet, la vraisemblance d'un arbre estime la probabilité de l'hypothèse qu'il véhicule (topologie + longueurs des branches), en fonction des données (séquences+modèle de l'évolution). En d'autres termes, ces méthodes permettent de trouver l'arbre dont la vraisemblance, étant donnés le modèle

d'évolution choisi et les séquences observées, est maximale. La méthode de vraisemblance est considérée souvent comme la plus fiable de toutes. Cependant, elle est très contraignante en terme de temps de calcul.

L'approche bayésienne

L'introduction de cette méthode en phylogénie remonte à 1996. L'approche bayésienne est fondée sur le calcul de probabilités postérieures des arbres phylogénétiques par la combinaison d'une probabilité *a priori* avec la fonction de vraisemblance. L'implémentation de certains algorithmes de statistique dans les programmes d'analyses, permet l'analyse relativement rapide de jeux de données conséquents et confère à l'approche bayésienne un attrait indéniable. Cette méthode a été évaluée en 2004, comme particulièrement prometteuse pour le futur de la reconstruction phylogénétique (Delsuc & Douzery, 2004).

Dans toutes les méthodes de reconstruction phylogénétique citées ci-dessus, la fiabilité des arbres phylogénétiques est testée par le bootstrap et on considère généralement que les branches définies par une valeur de bootstrap >95% sont fiables. Mille répliquions de bootstrap sont nécessaires pour que la méthode soit statistiquement valable.

1.4. Taxonomie du genre *Xanthomonas*

a. Généralités

Les *Xanthomonas* sont des bactéries aérobies strictes, mobiles par un flagelle polaire unique, formant des colonies lisses et mucoïdes, et qui produisent un exopolysaccharide caractéristique (xanthane) à l'origine de la consistance visqueuse des colonies. Les *Xanthomonas* appartiennent au phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Xanthomonadales et à la famille des Xanthomonadaceae (Saddler & Bradbury, 2005). Depuis la première description d'une infection à *Xanthomonas* en 1883 par Wakker (Vauterin *et al.*, 1993), la classification du genre *Xanthomonas* ne cesse d'évoluer en suivant les tendances de la taxonomie bactérienne.

Une taxonomie basée sur le concept "new host-new species"

Les *Xanthomonas* sont caractérisés par une très grande diversité pathologique. Cette diversité pathologique était à l'origine du concept « new host-new species » selon lequel chaque variant montrant une gamme d'hôte différente ou produisant des symptômes particuliers était

classé dans une nouvelle espèce (Starr, 1981). Ainsi, le nombre d'espèces résultant de cette pratique s'est rapidement accru et le genre *Xanthomonas* devint très complexe avec plus d'une centaine d'espèces.

En 1980, avec la création des « Approved lists of bacterial names », des nouvelles règles de nomenclature ont été établies et seules cinq espèces du genre *Xanthomonas* ont été retenues dans cette liste, *X. campestris* (espèce type), *X. fragariae*, *X. axonopodis*, *X. albilineans* et *X. ampelina* (Dye & Lelliott, 1974; Skerman *et al.*, 1980). L'initiative de la création de cette liste a été prise en 1976 lors de la révision du Code International de la Nomenclature des Bactéries dont la première version a été publiée en 1948. Les espèces nouvellement décrites (nomenspecies) mais non publiées dans les « Approved lists of bacterial names » ont été regroupées sous le même nom d'espèce, *Xanthomonas campestris* (Young *et al.*, 1978). Cette nomenclature, peu satisfaisante, a été rapidement abandonnée.

Une nouvelle nomenclature spécifique aux bactéries phytopathogènes basée sur la subdivision des espèces en pathovars a été proposée par la suite (Young *et al.*, 1978). Ainsi, la Société Internationale de Pathologie Végétale (International Society for Plant Pathology) publia une liste des standards d'utilisation du terme pathovar (Dye *et al.*, 1980). Suite à cette publication, une reclassification du genre *Xanthomonas* a été effectuée et de nombreuses nomenspecies sont devenues des pathovars de l'espèce *X. campestris*. Aussi, quelques remaniements ont eu lieu au sein du genre *Xanthomonas*. *Xanthomonas ampelina* a été reclassée dans le genre *Xylophylus* et des nouvelles espèces ont fait leur apparition dans le genre *Xanthomonas* notamment, *X. populi* qui, jadis, appartenait au genre *Aplanobacter* (De Vos, 1983; Ridé & Ridé, 1992).

En 1990, une étude basée sur les caractères phénotypiques de 266 souches a montré qu'il existe au moins 8 espèces dans le genre *Xanthomonas* : *X. maltophilia* (jadis *Pseudomonas maltophilia*), *X. oryzae* (autrefois *X. campestris* pv. *oryzae*) (Swings *et al.*, 1990), *X. albilineans*, *X. fragariae*, *X. populi*, *X. graminis*, *X. campestris* et *X. axonopodis* (Van den Mooter & Swings, 1990).

Taxonomie moléculaire et évolutive du genre Xanthomonas

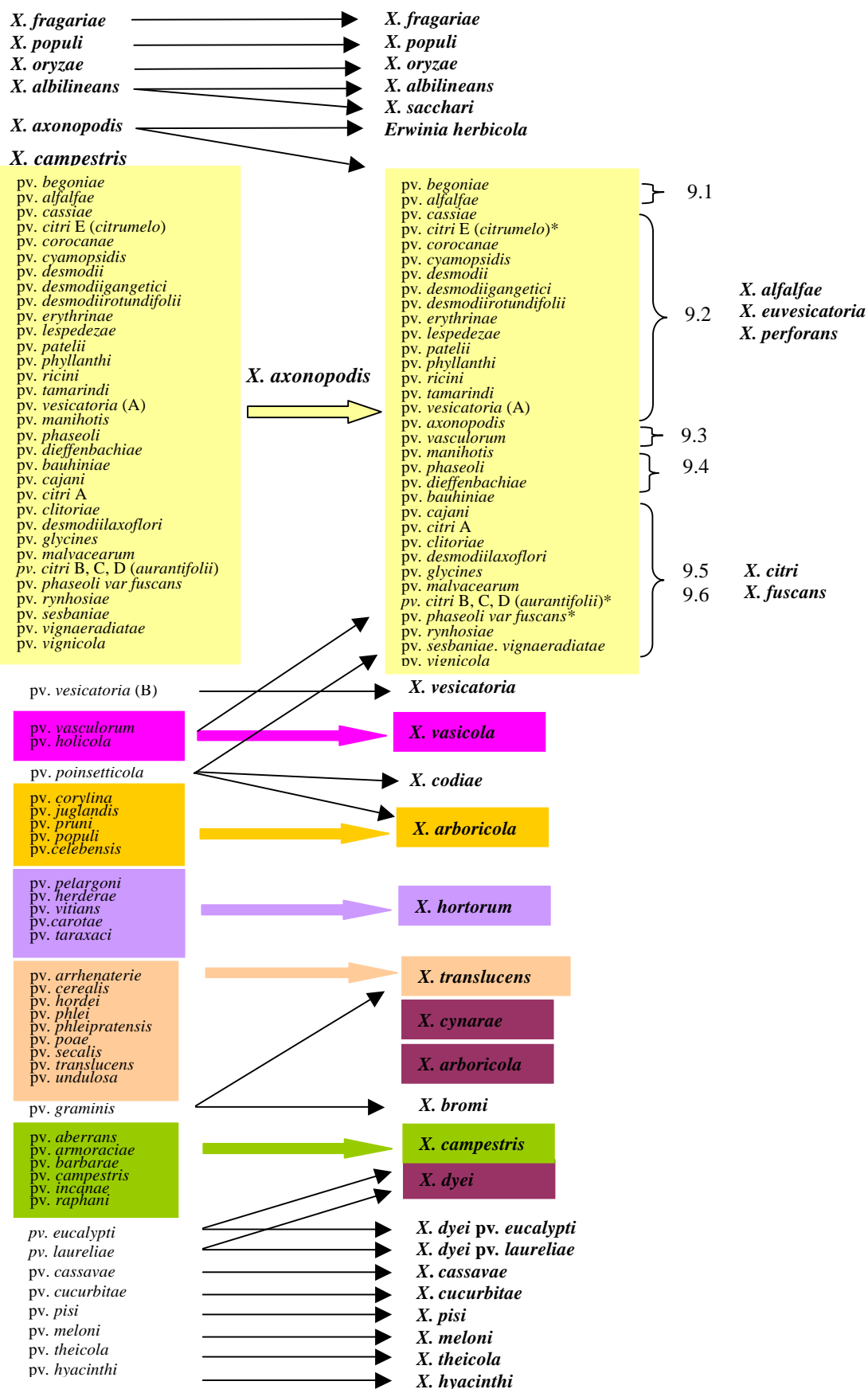
En 1995, sur la base des hybridations ADN-ADN d'une collection de 183 souches, Vauterin *et al.* proposèrent une reclassification du genre *Xanthomonas* en 20 espèces génomiques (20 groupes d'homologie ADN-ADN) dont 4 étaient déjà décrites (Figure 1.4) (Vauterin *et al.*,

1995). En 2005, sur la base de résultats REP-PCR de 339 souches du genre *Xanthomonas*, Rademaker *et al.* identifient 20 groupes correspondant aux 20 groupes d'homologie ADN-ADN de Vauterin *et al.* (Rademaker *et al.*, 2005). Par la suite, des nouvelles espèces de *Xanthomonas* ont été définies sur la base d'une taxonomie polyphasique. Parmi ces nouvelles espèces, on peut citer *X. cynarae* (Trébaol *et al.*, 2000), *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* (Jones *et al.*, 2004), *X. citri*, *X. fuscans*, *X. alfalfae* (Schaad *et al.*, 2005, 2006). Une dernière espèce, *X. dyei*, a été décrite récemment (Young *et al.*, 2010). Certains pathovars n'ayant pas subi de reclassification depuis les années 1980 ont été récemment reclassifiés sur la base de données de séquence *gyrB* (Tableau 1.1) (Parkinson *et al.*, 2009)

Récemment, des travaux basés sur une analyse MLSA suggèrent une synonymie entre certaines de ces espèces notamment entre *X. euvesicatoria*, *X. perforans* et *X. alfalfae* (Parkinson *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2008), *X. gardneri* et *X. cynarae* (Parkinson *et al.*, 2007 ; Young *et al.*, 2008). Toutefois, ces études étaient limitées uniquement sur les souches types. Aussi, sur la base d'une taxonomie polyphasique et de la MLSA, certains auteurs ont suggéré que *X. citri* et *X. fuscans* sont des espèces synonymes (Ah-You *et al.*, 2009 ; Parkinson *et al.*, 2009).

Avant la reclassification de 1995

Classification actuelle


 Figure 1.4 : classification actuelle du genre *Xanthomonas*

<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>citri</i>	<i>X. translusens</i>
<i>X. pv. alangii</i>	<i>X. pv. centellae</i>	<i>X. pv. gummisudans</i>
<i>X. pv. amaranthicola</i>	<i>X. pv. durantae</i>	
<i>X. pv. amorphophalli</i>	<i>X. pv. malloti</i>	<i>X. oryzae</i>
<i>X. pv. argemones</i>	<i>X. pv. mangiferaeindicae</i>	<i>X. pv. leersiae</i>
<i>X. pv. betae</i>	<i>X. pv. viticola</i>	
<i>X. pv. blepharidis</i>	<i>X. pv. vitiscarnosae</i>	<i>X. hortorum</i>
<i>X. pv. carissae</i>	<i>X. pv. vitistrifoliae</i>	<i>X. pv. nigromaculans</i>
<i>X. pv. clerodendri</i>	<i>X. pv. vitiswoodrowii</i>	
<i>X. pv. convolvuli</i>		<i>X. sacchari</i>
<i>X. pv. coriandri</i>	<i>X. citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>	<i>X. pv. cannae</i>
<i>X. pv. daturae</i>	<i>X. pv. azadirachtae</i>	
<i>X. pv. fici</i>	<i>X. pv. bilvae</i>	<i>X. campestris</i>
<i>X. pv. heliotropii</i>	<i>X. pv. leeana</i>	<i>X. pv. papavericola</i>
<i>X. pv. ionidii</i>	<i>X. pv. thespesiae</i>	<i>X. pv. plantaginis</i>
<i>X. pv. lawsoniae</i>		
<i>X. pv. uppalii</i>	<i>X. fuscans</i>	<i>X. axonopodis</i> (9.4)
<i>X. pv. vernoniae</i>	<i>X. pv. aracearum</i>	<i>X. pv. passiflorae</i>
<i>X. pv. mirabilis</i>	<i>X. pv. merremiae</i>	<i>X. pv. syngonii</i>
<i>X. pv. olitorii</i>	<i>X. pv. thirumalacharii</i>	
<i>X. pv. paullinae</i>		<i>X. vasicola</i>
<i>X. pv. pennamericanum</i>	<i>X. arboricola</i>	<i>X. pv. arecae</i>
<i>X. pv. physalidis</i>	<i>X. pv. arracaciae</i>	<i>X. pv. musacearum</i>
<i>X. pv. sesami</i>	<i>X. pv. guizotiae</i>	
<i>X. pv. spermacoces</i>	<i>X. pv. zantedeschiae</i>	
<i>X. pv. tribuli</i>		
<i>X. pv. viegasii</i>		
<i>X. pv. zingibericola</i>		

Tableau 1.1 : reclassification de certains pathovars du genre *Xanthomonas* qui n'étaient pas, autrefois, attribués à une espèce et qui étaient placés par défaut dans l'espèce *X. campestris* (Parkinson *et al.*, 2009)

b. Positionnement taxonomique des *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne

La classification des *Xanthomonas* associées à la gale bactérienne des Solanées a suivi plusieurs remaniements au cours du temps. Cela est dû en grande partie à la complexité de la situation, puisqu'il a été mis en évidence progressivement que plusieurs taxons étaient responsables d'un même faciès de maladie. Ce constat est récent puisqu'il a fallu attendre pratiquement 70 ans entre la première découverte des souches de l'agent pathogène et la remise en question qu'un unique taxon était responsable de cette maladie des Solanées. Nous présentons ci-dessous les principales étapes chronologiques des avancées taxonomiques en nous attachant à montrer comment les nombreuses études s'appuyant sur des analyses

phylogénétiques et des données de diversité phénotypique et génétique se sont complétées et ont contribué au cours du temps à l'élucidation de ce système complexe.

Taxon antérieur : X. campestris pv. vesicatoria

Vers les années 1920, trois souches de l'agent pathogène responsable de la gale bactérienne, ont été décrites. Les deux premières ont été isolées sur tomate en Afrique du sud (Doidge, 1921) et aux Etats-Unis (Gardner & Kendrick, 1921), et nommées respectivement *Bacterium vesicatorium* et *Bacterium exitiosa*. La troisième souche a été isolée sur piment (Sherbakoff, 1918). Toutes les souches furent ensuite regroupées au sein du taxon *B.vesicatorium* Doidge. Ainsi, jusqu'en 1990, on considérait que la gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* était causée par une seule espèce de bactérie nommée dans un premier temps *B. vesicatorium*, avant d'être reclassée dans différents genres. D'abord dans le genre *Pseudomonas* sous le nom de *Pseudomonas vesicatoria*, puis le genre *Phytomonas* sous le nom de *Phytomonas vesicatoria* et enfin dans le genre *Xanthomonas* sous le nom de *Xanthomonas vesicatoria* puis *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Dye *et al.*, 1980; Hayward & Waterston, 1964). D'autre part, en 1957, une bactérie est isolée sur tomate en Yougoslavie et est dénommée *Pseudomonas gardneri* (Sutic, 1957). Plus tard, les travaux de Dye ont montré, à l'aide de données morphologiques et biochimiques, que cette bactérie appartenait au genre *Xanthomonas*, et ont proposé cette bactérie comme synonyme de *X. vesicatoria* (c'est à dire synonyme de *X. campestris* pv. *vesicatoria*) (Dye, 1966). Ces données ont plus tard été confirmées par des données d'hybridations ADN/rARN (DeLey, 1978).

Les années 90 : plus d'une espèce de Xanthomonas est responsable de la gale bactérienne des Solanées

X. campestris* pv. *vesicatoria* est scindé en deux espèces, *X. vesicatoria* et *X. axonopodis* pv. *vesicatoria

Malgré la mise en évidence d'une grande diversité phénotypique au sein des souches associées à la gale bactérienne, il a fallu attendre les années 90 pour montrer que plus d'une espèce de *Xanthomonas* était responsable de cette maladie des Solanées. Certaines de ces études ont été basées sur une approche taxonomique polyphasique et ont montré l'existence de deux groupes A et B distincts génétiquement et phénotypiquement (Stall *et al.*, 1994; Vauterin *et al.*, 1990; Vauterin *et al.*, 1991). Vauterin s'est basé sur des hybridations ADN/ADN associées à l'analyse des profils des acides gras ainsi que des profils protéiques

obtenus en SDS PAGE. Dans le cas de Stall, les études d'homologies ADN/ADN ont été complétées par des analyses enzymatiques (hydrolyse du pectate et de l'amidon), l'étude de profils d'assimilation de différentes sources carbonées (Biolog GN), des analyses sérologiques à l'aide d'anticorps monoclonaux, l'étude des profils protéiques obtenus par électrophorèse en SDS PAGE, ainsi que l'étude des profils de restriction de l'ADN génomique en champ pulsé.

Bouzar *et al.* ont également caractérisé par des analyses phénotypiques (utilisation de différentes sources carbonées, sérologie, profils d'acides gras et typage des races) une collection mondiale de souches de *X. campestris* pv. *vesicatoria* et ont retrouvé la différenciation des deux groupes A et B (Bouzar *et al.*, 1994b). Un caractère discriminant entre les groupes A et B est la présence de fortes activités amylolytiques et pectinolytiques pour les souches du groupe B. Ils ont également montré qu'il existait une forte diversité phénotypique à l'intérieur de ces deux groupes.

En 1995, Vauterin *et al.* ont proposé une reclassification du genre *Xanthomonas*, basée sur des hybridations ADN/ADN associées à des analyses biochimiques (Biolog GN). Ils ont reclassé *X. campestris* pv. *vesicatoria* en deux espèces, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et *X. vesicatoria* qui correspondent respectivement aux groupes A et B.

X. gardneri* semble distinct de *X. campestris* pv. *vesicatoria

Des études d'hybridation ADN/ADN réalisées entre *X. gardneri* et *X. campestris* pv. *vesicatoria* ont montré que les valeurs de réassociation entre ces deux espèces étaient faibles, alors que *X. gardneri* montrait des pourcentages de réassociation de plus de 60% avec *X. campestris* pv. *taraxaci* et *X. campestris* pv. *pelargonii* (Hildebrand *et al.*, 1990; Palleroni *et al.*, 1993).

Vers la mise en évidence d'une plus grande diversité

En 1995, Jones *et al.* ont décrit de nouvelles souches isolées de Floride, qui se distinguent des groupes A et B par leurs réactions différentes vis-à-vis des anticorps monoclonaux spécifiques de ces groupes, par leur pouvoir pathogène (nouvelle race T3, voir plus loin le paragraphe 5.4), et par un profil unique en électrophorèse et en champs pulsés (Jones *et al.*, 1995). Par contre, elles possèdent des caractéristiques phénotypiques communes à chacun des groupes, et notamment les fortes activités amylolytiques du groupe B. Un nouveau groupe phénotypique C fut alors décrit. Bouzar en 96 a caractérisé selon des critères similaires une collection de

souches isolées de tomate et piment au Mexique, et y a également trouvé des souches du groupe C (Bouzar *et al.*, 1996). De même Sahin *et al.* signalent l'existence de souches de la race T3 (groupe C) isolées de tomates dans l'Ohio (Sahin & Miller, 1996). D'autre part, des souches isolées de piment et tomate dans les Caraïbes et en Amérique Centrale ont été caractérisées phénotypiquement (activités pectinolytique et amylolytique, Biolog N, sensibilité au cuivre et à la streptomycine, races, phagovars) et génétiquement (profils rep-PCR : BOX, REP et ERIC). Des hybridations ADN/ADN ont été également réalisées dans certains cas, sans présentation des données (Bouzar *et al.*, 1999). Ces résultats ont montré la présence d'une majorité de souches du groupe A, quelques souches du groupe B mais aucune souche du groupe C. D'autre part, une partie des souches isolées à la Barbade se sont montrées sérologiquement similaires aux souches A mais par contre fortement amylolytiques. Des hybridations ADN/ADN ont montré qu'elles étaient très proches des souches A. Elles ont été nommées A1. Enfin quelques souches isolées au Costa Rica, se sont révélées appartenir à *X. gardneri*, sur la base d'études d'homologie ADN/ADN et de critères phénotypiques.

D'autre part, en 1995, Louws *et al.* ont typé par rep-PCR une importante collection de souches isolées de piment et tomate, d'origines géographiques variées. Ils ont identifié sans ambiguïté quatre génotypes, dont deux correspondaient phénotypiquement aux groupes A et B (Louws *et al.*, 1995). Un des autres génotypes était représenté par deux souches isolées de tomate dans l'Ontario. Les profils rep-PCR ont révélé qu'elles étaient très proches de souches de *X. campestris* incluses dans leur étude.

Début des années 2000 : reclassification des Xanthomonas associés à la gale bactérienne des Solanées en quatre espèces

En 2000, Jones *et al.* ont caractérisé par une approche polyphasique 17 souches de *Xanthomonas* spp. isolées de tomate et piment représentatives des cinq groupes phénotypiques (A, A1, B, C, D). Les hybridations ADN/ADN ont été complétées par des données de séquence du gène *rrs* (codant pour l'ARNr 16S) et de l'espace intergénique (IGS) situé entre le gène *rrs* et le gène *rri* (ARNr 23S), par l'analyse des profils de restriction enzymatique de l'ADN génomique obtenus par électrophorèse en champs pulsés (PFGE), ainsi que par des analyses sérologiques, biochimiques et des tests de pouvoir pathogène. Les données d'hybridation montrent que les souches A1 et A sont très proches (valeurs d'hybridation supérieures à 80 %) et que les souches du groupe C, même si elles sont

distinctes des souches du groupe A (valeurs d'hybridation comprises entre 50 à 60% pour les souches C hybridées contre les souches A, et valeurs > 80% pour la réciproque), peuvent être regroupées avec ces dernières au sein de la même espèce. L'analyse phylogénétique de l'arbre issu du séquençage du gène *rrs* et de l'IGS, révèle également que les souches des groupes A, A1 et C sont extrêmement liées. Basé sur ces résultats, les auteurs suggèrent le classement des souches du groupe C au sein de l'espèce *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, au rang de sous-espèce. Enfin, les auteurs confirment dans cette étude que *X. gardneri* est bien une troisième espèce, responsable de la gale bactérienne des Solanées. Les auteurs décrivent donc dans cette publication trois espèces génomiques, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (souches A, A1 et C), *X. vesicatoria* (souches B) et *X. gardneri* (souches D) (Figure 1.5) (Jones *et al.*, 2000).

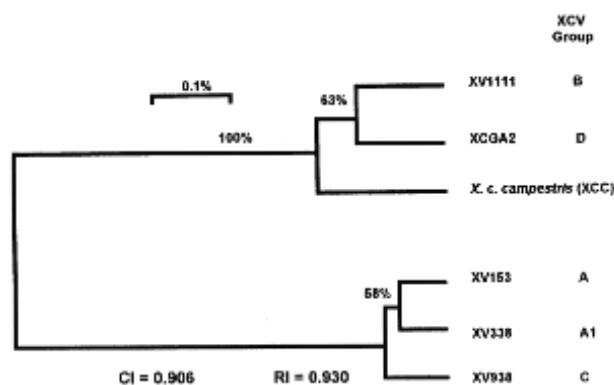


Figure 1.5 : arbre phylogénétique des différents groupes phénotypiques de *Xanthomonas* spp. associés aux Solanées à partir des séquences de l'ADNr 16S et de l'IGS (Jones *et al.*, 2000).

Par ailleurs, en 2004, des études de diversité réalisées sur une collection de souches isolées de tomate et de piment en Serbie, à l'aide de la technique PCR-RFLP ciblant un fragment d'ADN de 420 pb de la région *hrp*, ont montré l'existence de quatre profils différents correspondant aux quatre groupes A, B, C et D (Obradovic *et al.*, 2004b).

Toujours en 2004, Jones *et al.* ont réalisé des hybridations ADN/ADN avec trente souches de diverses espèces de *Xanthomonas* dont 17 appartenant aux différents groupes des *Xanthomonas* spp. des Solanées. D'après les données obtenues, comparées à d'autres espèces de *X. axonopodis* y compris la souche type, les souches du groupe A montrent des valeurs d'hybridation inférieures à 70%. Aussi, comparées avec les souches des groupes B, C et D, les souches du groupe A affichent des valeurs d'hybridation inférieures à 70%. De même, les souches du groupe D, présentent des valeurs d'hybridation inférieures à 70% avec toutes les

autres *Xanthomonas* excepté *X. campestris* pv. *taraxaci* et *X. campestris* pv. *nigromaculens*. Compte tenu de ces résultats, deux nouvelles espèces ont été proposées : *X. euvesicatoria* correspondant aux souches du groupe A et *X. perforans* pour les souches du groupe C.

X. gardneri est également élevé au rang d'espèce. En résumé, ces travaux de 2004 proposent la re-classification des *Xanthomonas* spp. affectant les tomates et piments en cinq groupes phénotypiques (A, A1, B, C et D), quatre groupes génomiques (A, B, C et D) et quatre espèces : *X. euvesicatoria* (groupe A), *X. perforans* (groupe C), *X. vesicatoria* (groupe B) et *X. gardneri* (groupe D) (Jones *et al.*, 2004).

Fin des années 2000 : X. euvesicatoria et X. perforans sont probablement synonymes

Une analyse phylogénétique de différentes espèces de *Xanthomonas* basée sur la comparaison des séquences partielles du gène *gyrB* (codant pour la gyrase B) des souches types a montré que *X. perforans*, *X. euvesicatoria* et *X. alfalfae* possédaient des séquences *gyrB* identiques. Cela a été confirmé par le séquençage de cinq autres gènes de ménage pour lesquels des variations mineures de séquence ont été mises en évidence. Cette étude a également montré que *X. gardneri*, *X. cynarae* et certaines souches de *X. hortorum* étaient très proches (Parkinson *et al.*, 2007). En 2009, les mêmes auteurs ont réalisé une étude similaire avec 203 souches de divers *Xanthomonas*, comprenant entre autres toutes les souches références des différents pathovars. *X. euvesicatoria*, *X. perforans* et *X. alfalfae* sont retrouvés dans le même clade, dénommé « complexe d'espèces *X. euvesicatoria* » qui comprend également un grand nombre de pathovars appartenant à l'espèce *X. axonopodis* (n=21), ainsi que des pathovars de l'espèce *X. campestris* très peu caractérisés (n=26). Les auteurs ont confirmé à nouveau l'inclusion de *X. gardneri*, *X. cynarae* et *X. hortorum* dans un même clade (Figure 1.6). Néanmoins, cette étude ainsi que la précédente n'a été réalisée que sur les souches types des différentes espèces associées à la gale bactérienne (Parkinson *et al.*, 2009).

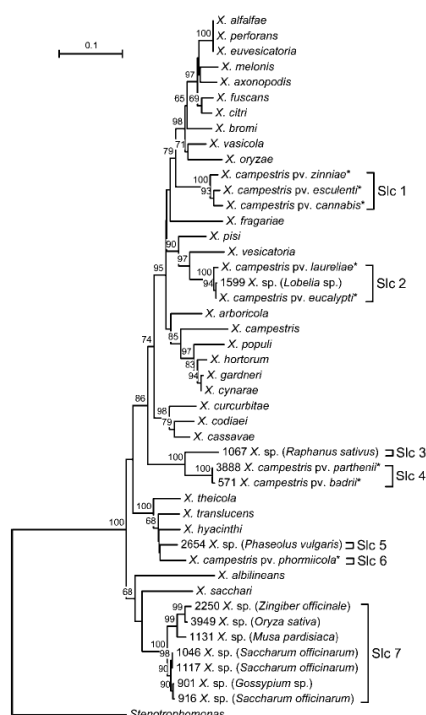


Figure 1.6 : arbre phylogénétique du genre *Xanthomonas* à partir des séquences de *gyrB* (Parkinson *et al.*, 2009)

D'autre part, Young *et al.* ont réalisé une analyse MLSA du genre *Xanthomonas* en séquençant quatre gènes de ménage (*dnaK*, *fyuA*, *gyrB* et *rpoD*) pour 119 souches représentatives de toutes les espèces de *Xanthomonas* validées par des publications (Young *et al.*, 2008). Les résultats ont montré que *X. gardneri* et *X. cynarae* étaient des espèces synonymes, distinctes de *X. hortorum*. La synonymie entre *X. euvesicatoria* et *X. perforans* a de nouveau été évoquée et les auteurs suggèrent leur classement comme sous-espèce de *X. axonopodis*. Cependant, encore une fois dans cette étude le nombre de souches de *Xanthomonas* spp. des Solanées analysées était très réduit.

Quid des souches proches de X. campestris pv. *raphani*?

Dans la plupart des introductions bibliographiques récentes consacrées à la taxonomie des *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne des Solanées, il n'est mentionné que les quatre espèces de *Xanthomonas* décrites plus haut. Il est cependant intéressant de noter que, dès 1930, la tomate avait été décrite comme hôte de *X. campestris* pv. *raphani* (White, 1930). Plus récemment, Louws *et al.* ont montré qu'il existait une proximité génétique de souches isolées de tomate en Ontario avec des souches de *X. campestris* pv. *campestris* (Louws *et al.*, 1995). Depuis, les travaux de Fargier et Manceau ont montré que *X. campestris* pv. *raphani*

était pathogène de la tomate et du poivron (Fargier & Manceau, 2007). Enfin, une épidémie de gale bactérienne sur tomate provoquée par *X. campestris* pv. *raphani* a été observée récemment sur tomate en Russie et au Canada (Kuflu & Cuppels, 1997 ; Punina *et al.*, 2009).

En conclusion

Les études présentées vont dans le sens de l'existence de cinq taxons responsables de la gale bactérienne : *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* et *X. campestris* pv. *raphani*.

2. Les Solanées

Exceptionnellement diversifiée, la famille des Solanées comprend entre 3000 et 4000 espèces, réparties à travers le monde en 90 genres aux morphologies variées : arbres, arbustes, lianes, herbes vivaces ou annuelles. La plupart des espèces pousse dans les régions tropicales, plus particulièrement en Amérique du sud. La famille des Solanées revêt une grande importance économique. En effet, elle renferme beaucoup de plantes ornementales (pétunia, datura, physalis...), industrielles (tabac), et surtout bon nombre de fruits et légumes (tomates, piments, poivrons, aubergine, pomme de terre...). A celles-ci s'ajoutent des plantes médicinales comme la belladone, la jusquiame, la morelle ou la stramoine.

2.1. La Tomate

Originaire de l'Amérique du Sud, dans la région montagneuse des Andes (Equateur, Pérou, Chili), la tomate fut domestiquée au Mexique, avant d'être importée en Europe au XVI^e siècle par les conquistadores (Peralta *et al.*, 2006). Elle est l'ingrédient de cuisine le plus consommé dans le monde après la pomme de terre. C'est une plante herbacée vivace mais cultivée comme annuelle, aux tiges ramifiées et port rampant. La tige est pubescente, épaisse aux entre-nœuds. Les feuilles sont composées (5 à 7 folioles), alternées et persistantes. Les fruits sont des baies formées de 2 à 3 loges, à graines très nombreuses, et dont la taille, la forme et la couleur varient avec les différentes variétés. Elle a une température optimale de croissance de l'ordre de 25°C et un thermopériodisme journalier de 10°C, conditions qu'elle a retenues de son origine montagnarde (Messiaen *et al.*, 1991). L'espèce cultivée de la tomate est communément connue sous le nom de *Lycopersicon esculentum* Mill. La classification de la

tomate fut l'objet de nombreuses controverses pendant plusieurs décennies. En effet, se basant uniquement sur des critères morphologiques, taxonomistes et botanistes proposèrent différents noms : *Lycopersicon esculentum* Mill *Solanum lycopersicum* L et *Lycopersicon lycopersicum*. (L.)Karsten (Peralta *et al.*, 2006). Bien que *Lycopersicon esculentum* soit le nom le plus répandu au sein de la communauté scientifique, des études génomiques récentes confirment l'appartenance de la tomate au genre *Solanum* qui comprend 13 espèces dont l'espèce cultivée (*Solanum lycopersicum*) (Peralta & Spooner, 2001; Spooner *et al.*, 2005).

En 2008, la production mondiale de la tomate s'élevait à 133 259 909 t. Les principaux pays producteurs sont la Chine, les USA, l'Inde, la Turquie, l'Egypte, l'Italie, l'Iran, le Brésil et l'Espagne (Tableau 1.2a). Dans la région de l'Océan Indien, la tomate est un élément essentiel de l'alimentation et en 2008 la production atteignait 46900 t (Tableau 1.2b).

Chine	33 911 702 t
USA	13 718 171 t
Inde	10 303 000 t
Turquie	10 985 355 t
Egypte	9 204 097 t
Italie	5 976 912 t
Iran	4 826 396 t
Brésil	3 867 655 t
Espagne	3 922 500 t
Mexique	2 936 773 t
Fédération Russe	1 938 710 t

Tableau 1.2a : production mondiale de tomate en 2008 (<http://faostat.fao.org/>)

Madagascar	22 000 t
Maurice	11 518 t
Réunion	12 640 t
Comores	550 t
Seychelles	190 t

Tableau 1.2b : production de tomate dans les îles de l'Océan Indien en 2008 (<http://faostat.fao.org/>)

Les maladies de la tomate

Plus de 200 maladies ayant des causes et des origines diverses (fongique, virale, bactérienne...), peuvent affecter la tomate (Blancard, 1988; Jones *et al.*, 1997). La plupart de ces maladies sont d'origine fongique. Suivant les différentes espèces, les dégâts causés à la plante par les champignons varient d'un organe à l'autre. En effet, certains champignons comme ceux responsables de l'alternariose (*Alternaria dauci* f. sp. *solani*), la moisissure grise (*Botrytis cinerea* pers.), la cladosporiose (*Cladosporium fulvum* cooke), l'Oïdium (*Leveillula*

taurica (Lèv) Arn), la stemphyliose (*Stemphylium* sp.) et du mildiou (*Phytophthora infestans* (Mont.) de By.) s'attaquent aux feuilles. D'autres espèces, parmi lesquelles, *Alternaria chartarum* Preuss, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wilts., *Botrytis cinerea* Pers., *Cladosporium herbarum* (Pers.) L.K., *Colletotrichum coccodes* (Wallr.), *Fusarium* sp., *Geotrichum candidum*, sont responsables de pourritures sur fruits. D'autres également, s'attaquent au système racinaire, à la tige et au collet. Les maladies causées par les virus causent des pertes énormes sur les cultures, toutefois l'incidence et la sévérité des infections virales diffèrent d'une année à l'autre. Une trentaine de virus environ, repartis, pour la plupart dans 13 familles, sont répertoriés sur tomate. Parmi les plus importants, 10 sont véhiculés par des insectes de la famille des Aphidae, 5 par des aleurodes, 2 par des thrips, 2 par des cicadelles, et 2 par hemiptères et coléoptères. Les bégomovirus transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci*, sont parmi les phytovirus les plus présents dans la région Océan Indien et sont responsables de nombreuses maladies émergentes dont les dégâts sur les cultures sont importants (Lefeuvre *et al.*, 2007). Quatre maladies bactériennes figurent parmi les plus importantes et les plus courantes dans les champs de tomate au niveau mondial :

- Le chancre bactérien causé par *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) est présent un peu partout dans le monde, en Europe, en Asie, en Afrique, en Amérique centrale et Caraïbes, en Amérique du sud et Océanie. Dans la région Océan Indien, la maladie est répertoriée à la Réunion. En plein champ, l'infection se traduit, sur feuille, par le dessèchement des bords des folioles principalement chez les feuilles inférieures suivis du dessèchement lent et général de la plante sans manifester de flétrissement, et souvent par des marbrures externes et très rarement des taches « oculaires » caractéristiques sur fruits.
- La moucheture bactérienne est décrite pour la première fois aux Etats-Unis et à Taiwan en 1933. Elle est actuellement présente un peu partout dans le monde. L'organisme causal (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) est listé parmi les organismes nuisibles de la tomate dans la région Océan Indien, et plus particulièrement à Maurice. La maladie se manifeste, sur les feuilles, par des petits points noirs habituellement inférieurs à 2 mm de diamètre, entourés d'une auréole jaune et par des taches noires rarement supérieures à 1mm de diamètre, entourées parfois d'un halo vert foncé, sur les fruits. Ces taches sur les fruits peuvent réduire considérablement leur valeur marchande.

- Le flétrissement bactérien dont l'agent responsable est *Ralstonia solanacearum*, est très répandu dans la plupart des régions chaudes, tropicales, subtropicales et à climat tempéré. La maladie est présente dans presque tous les pays de la zone Océan Indien. Le symptôme caractéristique de la maladie est le flétrissement irréversible de l'appareil végétatif aérien de la plante qui survient après blocage, par la bactérie de la circulation de l'eau dans la plante.
- La gale bactérienne causée par des bactéries du genre *Xanthomonas* est présente dans tous les continents, notamment dans les pays tempérés chauds et tropicaux. Dans la région Océan Indien, la maladie est présente à la Réunion et à Maurice, et des prélèvements réalisés récemment aux Seychelles, aux Comores et à Madagascar dans le cadre du Programme Régional de Protection des Végétaux (www.prpv.org) ont montré l'abondance de cette maladie sur tomate et piment. Malgré la présence abondante de cette maladie dans la région, il n'existe aucune donnée sur les espèces bactériennes rencontrées dans les pays de la zone. En conditions climatiques favorables, c'est à dire de température et humidité élevées, la maladie peut conduire à des défoliations sévères et à des abscissions précoces des fruits qui font chuter drastiquement les rendements. De plus, l'aspect des fruits attaqués, en particulier pour la tomate qui présente des tâches subérisées (gale), est un frein à leur commercialisation.

2.2. Le piment

Le piment est originaire d'Amérique du Sud et Centrale où il fut domestiqué dès 7000 ans av. J.-C. Il aurait été introduit pour la première fois en Europe, par Christophe Colomb et les navigateurs espagnols, à partir du Brésil en 1494. Ces derniers, qui se croyaient aux Indes, prirent ces petites baies piquantes pour des grains de poivre rouge ce qui illustre les premières appellations de « poivre d'Inde », « poivre d'Espagne » et plus tard du nom « poivron » qui en dérive. Des fouilles archéologiques réalisées dans les sites de Tamaulipas et Tehuacan au Mexique et dans une caverne en Amérique du Sud, ont révélé des graines et des fragments de piments vieux respectivement de 9000 et 7000 ans (Pernezny *et al.*, 2003). Son introduction en Afrique et en Asie a été favorisée par des voyageurs vers les comptoirs portugais et espagnols, mais elle est aussi l'œuvre des missionnaires franciscains et jésuites. Le piment appartient au genre *Capsicum* qui comprend 25 espèces dont 5 cultivées (*C. annuum* L., *C.*

baccatum L., *C. pubescens* Ruiz & Pav., *C. chinense* Jacq., *C. frutescens* L.). Les vingt espèces sauvages sont porteuses de gènes de résistance contre les organismes nuisibles. L'espèce *Capsicum annuum* L. est la plus cultivée au monde et la plus importante économiquement. La classification en espèce est basée sur la forme et l'usage du fruit. En français, par l'usage, le fruit comme la plante de *Capsicum annuum* sont désignés par deux vocables bien distincts (Chaux & Foury, 1994):

- **Piment**, pour les petits fruits, pointus et à saveur plus ou moins brûlante
- **Poivron**, pour les gros fruits doux, quelle qu'en soit la forme.

C'est une plante herbacée pouvant atteindre 40 à 50 cm de haut, annuelle en climat tempéré mais pérenne en zone tropicale, avec une tige très lignifiée. Les feuilles sont persistantes, entières, alternes, lancéolées et à sommet aigu. La température optimale de germination et de croissance se situe entre 25 à 31°C. Au dessous de 15°C et au dessus de 35°C, la germination aussi bien que la croissance de la plante sont fortement perturbées (Chaux & Foury, 1994; Pernezny *et al.*, 2003). La plante a un thermopériodisme journalier de 6°C. Le piment est consommé cru ou cuit comme légume, condiment ou épice. Ainsi, suivant l'usage, on distingue le piment légume, qui désigne la plante maraîchère dont les fruits sont consommés tels quel ou après une préparation culinaire (piment fort ou poivron), du piment épice cultivée de façon industrielle et destiné à la production de poudre. En 2009, la production mondiale de piment légume était de 28 millions de tonnes de fruits frais. La Chine est le premier producteur avec 14 millions de tonnes soit la moitié de la production mondiale (Tableaux 1.3a et 1.3b). Même si nous n'avons que des données partielles sur la production de piment dans les îles de l'Océan Indien, c'est est un élément majeur de la cuisine traditionnelle dans cette région (Tableaux 1.3c et 1.3d).

Inde	1 269 850 t
Chine	252 000 t
Pérou	165 000 t
Thaïlande	161 505 t
Pakistan	130 000 t
Bangladesh	117 765 t
Ethiopie	115 000t
Ghana	81 000 t
Vietnam	78 500 t
Myanmar	71 000 t
Mexique	60 000 t
Nigeria	50 000 t

Tableau 1.3a : production mondiale de piments doux et épicé en 2008 ([http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/))

Madagascar	3 400 t
Maurice	---
Réunion	700 t
Comores	---
Seychelles	---

Tableau 1.3b : production de piments doux et épicé dans les îles de l’Océan Indien en 2008 (<http://faostat.fao.org/>)

Chine	14 274 178 t
Mexique	2 054 968 t
Turquie	1 796 177 t
Indonésie	1 092 115 t
Espagne	992 200 t
Etats-Unis	909 810 t
Nigeria	725 000 t
Egypte	703 408 t
Rep de Corée	385 763 t
Pays-Bas	330 000 t
Italie	325 727 t

Tableau 1.3c : production mondiale de piments forts, piment doux frais en 2008 ([http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/))

Madagascar	90 t
Maurice	985 t
Réunion	---
Comores	---
Seychelles	---

Tableau 1.3d : production de piments forts, piments doux frais dans les îles de l’Océan Indien en 2008 (<http://faostat.fao.org/>)

Des nombreux travaux de sélection sont effectués afin d’améliorer un certain nombre de caractères de la plante tels que la résistance aux bio-agresseurs, la régularité de production et la qualité du fruit. L’objectif majeur de ces sélections étant la lutte contre les maladies et ravageurs. Le piment est devenu ainsi une espèce modèle pour la stratégie des cumuls des résistances. Ces sélections ont permis la mise en place, en France comme ailleurs, d’une filière de production et la commercialisation des semences ayant des retombées économiques non négligeables. En France, l’exportation des semences issues de sélection couvre 20% du marché mondial, pour un total de 50 M€ (Doré & Varoquaux, 2006). Nombreux sont les usages et les vertus du piment :

- épices et colorant alimentaire. Il donne du goût et de la couleur à une alimentation monotone à base de féculent. Il est également utilisé pour la production d’oléorésine, extrait lipophile riche en pigments rouges (capsantine et capsorubine) ayant un débouché important dans l’industrie agro-alimentaire. Ils servent, entre autres,

d'additifs naturels dans les boissons, l'industrie laitière (y compris la fromagerie), la pâtisserie, la confiserie et pour les aliments des volailles ;

- source de vitamine C (fruits vert surtout). Isolée et cristallisée pour la première fois à partir de fruits de piment, le jus des jeunes fruits en contient 20 à 30 fois plus que le jus d'orange ;
- source de vitamine E (alpha-tocophérol). Certaines variétés de piment contiennent 7mg d'alpha-tocophérol par portion de 100g (Ching & Mohamed, 2001). La noisette, considérée comme un aliment très riche en alpha-tocophérol, en contient 15 mg par portion de 100g ;
- source d'antioxydants. Les piments forts renferment plusieurs types d'antioxydants dont les plus actives sont la lutéoline, la capsaïcine et la quercétine (Lee *et al.*, 2005);
- la capsaïcine entre dans la fabrication de certains onguents utilisés par les athlètes pour chauffer les muscles avant la performance ou réparer foulures et entorses.
- Répulsif contre certains crustacés (les pouces-pieds), qui en se fixant sur les coques des navires, peuvent les endommager. Il est aussi actif contre les souris qui rongent les câbles électriques souterrains.
- Les alcaloïdes de piment peuvent être utilisés dans un programme de gestion de *Bemisia tabaci* en culture sous serre (Bouchelta *et al.*, 2005).

Principaux ennemis du piment

Divers maladies et ravageurs ont été décrit sur le piment. Parmi les plus dévastateurs figurent *Phytophthora capsici*, un champignon attaquant la plante par les racines et provoquant la pourriture du collet, un flétrissement brusque sans jaunissement et la mort de plantes de tous âges. D'autres maladies d'origine fongique, telles que l'oïdium dont l'agent causal est *Oidiopsis sicula* Scalia, l'anthracnose causée par des champignons appartenant au genre *Colletotrichum* ou encore la maladie de la pourriture du collet provoquée par *Sclerotium rolfsii* Sacc., peuvent causer des dommages énormes aux cultures et une perte importante de récoltes (Messiaen *et al.*, 1991; Pernezny *et al.*, 2003). Des virus phytopathogènes peuvent aussi affecter sérieusement le piment. Ainsi le *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) transmis par les thrips, le *Potato virus Y* (PVY) véhiculé principalement par le puceron vert du pêcher (*Myzus persicae*), le *Tobacco etch virus* (TEV) propagé par des insectes de la famille des

aphidae, le Tobacco mosaic virus (TMV) et le Tomato mosaic virus (ToMV) sont parmi les plus importants économiquement. Les pertes de rendement provoquées par ces virus sur piment sont de l'ordre de 30 à 70% pour le TMV et ToMV, 70% pour le TEV et peuvent atteindre les 100% pour le PVY si l'infection a eu lieu à un stade précoce de la plante (Pernezny *et al.*, 2003). Les maladies bactériennes affectant le piment sont les mêmes que celles décrites sur la tomate.

3. La gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* spp (piment et poivron)

3.1. Historique et répartition géographique

La gale bactérienne des Solanées ou « bacterial spot » a été observée pour la première fois aux Etats-Unis et en Afrique du sud respectivement en 1912 et 1914. En 1920, une première description de la maladie fut effectuée par Ethel Doidge (Doidge, 1921). La maladie est depuis répandue au niveau mondial, dans toutes les aires de production de ces deux cultures (Figure 1.7). Elle est plus sévère dans les régions tropicales et subtropicales où les températures sont élevées et les pluies abondantes (Pernezny *et al.*, 2003; Rudolph, 1993) La maladie est présente dans tous les pays de la région Océan Indien.

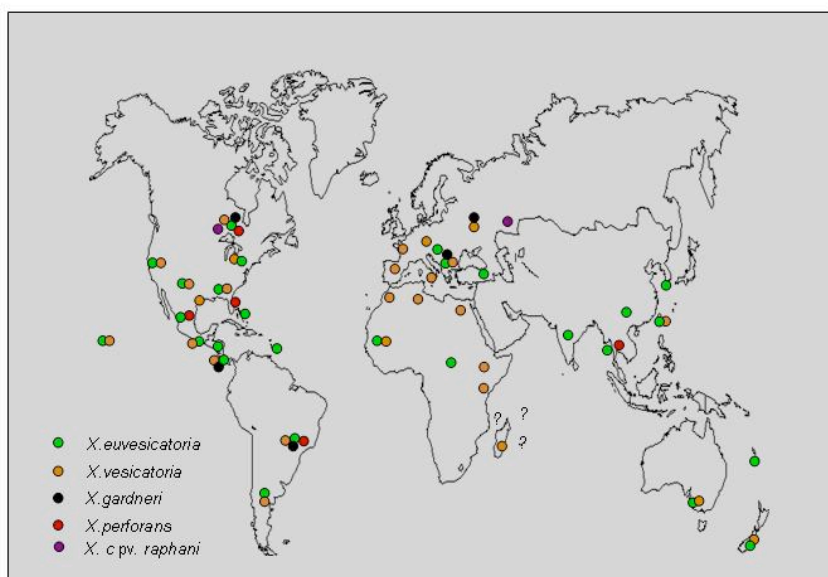


Figure 1.7 : répartition géographique des *Xanthomonas* spp. associés aux Solanées à graines (modifié d'après (Jones *et al.*, 1998) et (Obradovic *et al.*, 2008))

3.2. Symptomatologie

Les symptômes peuvent se manifester sur toutes les parties aériennes de la plante. Sur feuilles, tiges et pétioles de tomate, les lésions se présentent sous forme des zones circulaires (1-5 mm) saturées d'eau, d'abord vertes, puis brunes et nécrosées. Les lésions peuvent, parfois être entourées d'un halo jaune et lorsque les conditions sont favorables au développement de la maladie, elles coalescent et forment une plage nécrotique. Les fruits de tomate portent des taches subérisées de 2 à 10 mm de diamètre, circulaires et à marges saturées d'eau (Figures 1.8a et b).



Figure 1.8a : symptômes sur feuilles et fruits de tomates
(<http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/french/tomatoes/diseases-and-disorders/bacterial-spot.html>)



Figure 1.8b : symptômes sur tige de tomate (<http://www.forestryimages.org>)

Sur piment, la maladie présente des symptômes similaires sur tiges et pétioles. Cependant, sur les feuilles de piment, la taille et la forme des lésions sont variables (Stall & Civerolo, 1993). En général, les lésions sont concaves sur la partie supérieure de la feuille et légèrement convexes sur la partie inférieure (Figure.1.9a).



Figure 1.9a : symptômes sur feuilles de piment (<http://www.forestryimages.org>)

Sur fruits de piment, bien que rarement visibles, les symptômes se présentent sous formes de taches de 2 à 3 mm, vertes et circulaires au début, qui deviennent brunes, rugueuses et craquelées par la suite (Pernezny *et al.*, 2003) (Figure 1.9a). Chez les plantes inoculées de *Capsicum*, les symptômes n'apparaissent que sur les feuilles ; les bourgeons, les fleurs et les fruits demeurent sans symptômes mais chutent plus tard (Bashan & Okon, 1986).

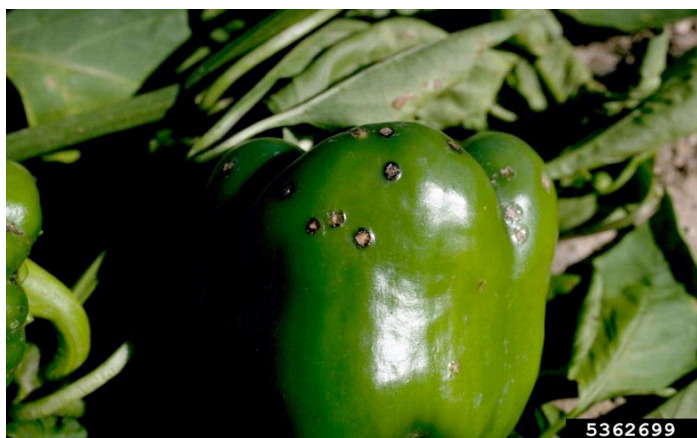


Figure 1.9b : symptômes sur fruits de poivron (<http://www.forestryimages.org>)

La partie gamme d'hôtes est traitée plus loin, dans le paragraphe 4.2.

3.3. Biologie et épidémiologie

Il y a très peu d'études récentes sur l'épidémiologie des *Xanthomonas* des Solanées et un certain nombre de résultats présentés ci après ont été obtenus avant la reclassification de l'agent pathogène en 4 espèces. Il n'est donc pas toujours évident de savoir sur quelle(s) espèce(s) ces résultats ont réellement été obtenus. Néanmoins, compte tenu des zones géographiques dans lesquelles les études épidémiologiques ont été menées et également compte tenu des hôtes concernés, il semblerait que dans la majorité des cas, l'espèce étudiée soit *X. euvesicatoria*.

a. Survie

L'agent pathogène de la gale bactérienne des Solanées se conserve bien dans les semences, les débris végétaux et les plants de tomate spontanés et peut servir d'inoculum primaire pour la maladie (Jones *et al.*, 1986). La survie de la bactérie dans les semences peut aller jusqu'à 10 ans (Bashan *et al.*, 1982). Dans les débris végétaux présents sur et dans le sol, la bactérie se maintient jusqu'à 6 mois (Jones *et al.*, 1986). Les plants de tomate spontanés peuvent héberger la bactérie pendant un an et peuvent servir de réservoir d'inoculum entre deux cultures.

Les *Xanthomonas* spp. des Solanées, comme beaucoup d'autres bactéries des plantes, vivent, dans un premier temps, de façon épiphyte au moins plusieurs semaines, à la surface des feuilles des plantes hôtes et non hôtes où elles se multiplient sans provoquer des symptômes (McGuire *et al.*, 1991; Pernezny & Collins, 1997 ; Sharon *et al.*, 1982b; Timmer *et al.*, 1987). La survie des bactéries sur les feuilles dépend des conditions environnementales. Des fortes valeurs d'humidité relative (HR > 90%) favorisent une multiplication de la bactérie sur les feuilles de tomates qui est 10 à 100 fois plus importante comparée à celle obtenue avec des faibles valeurs de HR (10-25%) (Timmer *et al.*, 1987). Cette population épiphyte constitue un réservoir d'inoculum (Leben, 1965). Des travaux montrent que même les variétés résistantes de tomates et piments, peuvent héberger une population épiphyte de l'agent pathogène qui serait une source d'inoculum potentielle pour les semences et les plantes sensibles environnantes (Pernezny & Collins, 1997). Cependant, les mécanismes de transition entre la phase épiphyte de la bactérie et sa phase pathogène ne sont pas très bien connus. Certains auteurs suggèrent une corrélation directe entre la taille de la population épiphyte et l'apparition de la maladie. C'est-à-dire qu'une augmentation importante de la population

épiphyte induirait l'apparition de la maladie (Hirano & Upper, 1983; McGuire *et al.*, 1991). D'autres pensent qu'une importante croissance de la population épiphyte serait subséquente ou concomitante à l'apparition de la maladie (Beattie & Lindow, 1999 ; Sharon *et al.*, 1982a). Une corrélation positive existe également entre la population épiphyte et la sévérité de la maladie (Jones *et al.*, 1991). Dans un champ, une seule plante avec une population épiphyte de la bactérie peut servir de source d'inoculum pour toute la plantation.

L'agent pathogène peut également vivre en épiphyte dans certaines mauvaises herbes, y compris des Solanées adventices qui se développent dans des plantations de tomates et piments, et peut servir de source d'inoculum (Jones *et al.*, 1986). Toutefois cette source est considérée comme mineure. La survie de la bactérie directement dans le sol est très faible, 2 semaines au maximum (Bashan *et al.*, 1982). Des travaux suggèrent que la bactérie persisterait dans les racines de tomate, blé et soja (Bashan *et al.*, 1982), une hypothèse qui reste à démontrer.

b. Infection

L'inoculum primaire provient dans la plupart de temps des semences ou de l'environnement des plantes (Blancard, 2009). En Turquie, les semences sont considérées comme une source majeure d'inoculum pour la maladie (Mirk & Aysan, 2009).

Les bactéries pénètrent dans les feuilles à travers les ouvertures naturelles comme les stomates, les lenticelles, les trichomes où via les blessures occasionnées par les effets du sable, des événements naturels (pluie, vent) (Pohronezny *et al.*, 1992; Rudolph, 1993) ou par les piqûres d'insectes tels que *Nezara viridula* (Blancard, 2009). Dans la feuille, si les conditions sont favorables, l'agent pathogène se multiplie dans les espaces intercellulaires du mésophylle avant de coloniser les cellules de l'épiderme inférieur et particulièrement le long des nervures (Sharon *et al.*, 1982a). Les premiers symptômes apparaissent entre 5 et 9 jours, d'abord sur la face inférieure de la feuille qui est très riche en stomates. (Blancard, 2009; Sharon *et al.*, 1982a). Dans les plants de tomate, le début de l'épidémie coïncide avec la maturation physiologique des premiers fruits (Marcuzzo *et al.*, 2009). Dans les plantes de piments, l'infection du fruit et par conséquent des graines, se fait via les fleurs mortes et les régions verruqueuses où prolifèrent les bactéries (Bashan & Okon, 1986). Les stomates jouent un rôle important dans le processus infectieux. En effet, la sévérité ainsi que la sensibilité de la plante hôte à la maladie, dépendent de la fréquence et de l'ouverture des stomates au

moment de l'inoculation (Ramos & Volin, 1987). La suppression chimique ou physiologique de l'ouverture des stomates s'accompagne d'une réduction de la sévérité de la maladie (Ramos & Volin, 1987).

Toutes les parties aériennes des plantes hôtes sont sensibles à la maladie. Cependant, les jeunes feuilles et fruits sont beaucoup plus sensibles jusqu'au stade mature où ils le sont moins (Bashan, 1985; Rudolph, 1993).

Par ailleurs, des interactions existent entre certaines espèces du complexe *Xanthomonas spp.* des Solanées, notamment *X. perforans* et *X. euvesicatoria*. En effet, il a été démontré que *X. perforans* secrète 3 bactériocines (BCN-A, BCN-B et BCN-C) qui lui confère un avantage compétitif au champ en cas de co-infection avec *X. euvesicatoria* (Hert *et al.*, 2005). A titre d'exemple, jusqu'en 1990, *X. euvesicatoria* était la seule espèce présente dans les champs en Floride. L'espèce *X. perforans* y est apparue à partir de 1991 et elle a supplanté *X. euvesicatoria* (Jones *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1998).

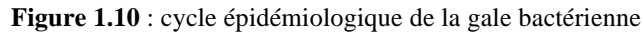
La bactérie est estivale et son optimum de croissance se situe aux alentours de 26°C avec des plages de croissance allant de 20 à 35°C. Les nuits chaudes comprises entre 23 et 27°C ainsi que les fortes hygrométries consécutives aux orages, aux rosées ou à l'irrigation sont les conditions appropriées au développement de la maladie (Blancard, 2009). Des températures nocturnes inférieures à 16°C limitent le développement de la bactérie.

c. Dissémination

La dissémination de l'agent pathogène entre plants voisins, au champ et à courte distance se fait principalement par le biais des événements climatiques associant vent et pluie notamment les cyclones et les tempêtes ou des projections d'eaux survenant lors des pluies et des irrigations par aspersion. En effet, au cours des pluies et de l'irrigation, les rejaillissements des gouttelettes d'eau favorisent la dispersion de la maladie entre plantes voisines. La partie aérosol de ces éclaboussures peut être transportée par le vent à longue distance (Blancard, 2009). Aussi, lors des opérations d'entretien des jeunes plants notamment l'éclaircissage, l'élagage, et le tuteurage et au moment des récoltes, des microparticules contenant la bactérie, sont entraînées dans l'air par un mécanisme de flux d'air ascendant et contribuent ainsi à la dissémination de la maladie (Lindemann & Upper, 1985; McInnes *et al.*, 1988). La présence des bactéries dans ces particules aéroportées est plus importante en saison sèche qu'en saison humide (Lindemann & Upper, 1985; McInnes *et al.*, 1988). Lors de ces travaux d'entretien

des cultures, le risque de contamination entre plantes voisines est plus élevé le matin où les plantes sont généralement humides que l'après midi où les plantes sont sèches (Pohronezny *et al.*, 1990). Les ouvriers travaillant et circulant dans les cultures lorsque celles-ci sont humides, contribuent également à la dispersion de la bactérie. La quantité de germes dans les mains d'un ouvrier lors d'un contact de 20 secondes avec le feuillage d'une plante malade est de l'ordre de 10^6 cfu (Pohronezny *et al.*, 1990). Tout animal, insecte, matériel ou être humain qui passe dans un champ infesté peut être un vecteur de dissémination de la bactérie (Bashan, 1985). Dans des conditions climatiques cycloniques, la dissémination de l'agent pathogène peut se faire dans un rayon de 32m et suivant les vents dominants (Bernal & Berger, 1996). La bactérie a été isolée à partir de plusieurs insectes comme *Aulacophora concta*, *Eucoptera praemorsa*, *Phanoroptera gracilis*... (Blancard, 2009).

Les disséminations sur des longues distances se font principalement par les semences, les plants contaminés ainsi que le matériel végétal destiné à la propagation (Blancard, 2009; Rudolph, 1993). Une représentation du cycle épidémiologique de la gale bactérienne est montrée Figure 1.10.



3.4. Méthodes de lutte

La gale bactérienne représente une menace permanente pour la production et la commercialisation de tomates. La lutte chimique permet de lutter de façon ponctuelle contre la maladie. Les antibiotiques comme la streptomycine ont été utilisés de par le passé mais leur utilisation n'est plus autorisée compte tenu de l'apparition des souches bactériennes résistantes (Canteros *et al.*, 1990 ; Jones *et al.*, 1991; Ritchie & Dittapongpitch, 1991). L'utilisation du cuivre ne fait que retarder l'apparition des symptômes. Une nouvelle classe de molécules chimiques commence à être utilisée comme alternative au cuivre, notamment l'acibenzolar-S-methyl (ASM). Cette molécule induit, chez la plante, une Résistance Systémique Acquise (SAR) à l'égard de l'agent pathogène, réduisant ainsi l'incidence de la maladie sur la plante (Louws *et al.*, 2001; Obradovic *et al.*, 2004a). D'autres nouveaux composés comme l'ammonium lignosulfonate (ALS) (Abbasi *et al.*, 2002), un mélange fait d'huile de neem et d'une émulsion de poisson (Abbasi *et al.*, 2003), le compost (extrait liquide) (Al-Dahmani *et al.*, 2003) sont aussi utilisés afin de contrôler la gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum*. Des bactériophages spécifiques à l'agent pathogène, sont également utilisés seuls ou en combinaison avec l'ASM et permettent de réduire significativement la charge infectieuse ainsi que le nombre et le diamètre des spots (Buonaurio *et al.*, 2002; Obradovic *et al.*, 2004a). Une autre stratégie consiste à utiliser des agents de biocontrôle dans les cultures de plein champ ou sous abri, en particulier des bactéries promotrices de la croissance des plantes (*Rhizobacteria*, *P. fluorescens* 89B-61, *Bacillus pumilus*) qui agissent comme l'ASM en induisant une Résistance Systémique Acquise (Ji *et al.*, 2006; Obradovic *et al.*, 2004a), ainsi que des bactéries non pathogènes agissant par antagonisme (Colin *et al.*, 1984; Hert *et al.*, 2005). Actuellement on privilégie plus les méthodes de lutte non chimiques comme l'utilisation des semences saines, des variétés résistantes, des pratiques culturales permettant d'éviter ou de retarder la contamination des plantes et des agents de biocontrôle. Néanmoins, aucune des méthodes précitées n'est efficace à 100%. Ainsi, la meilleure stratégie à mettre en œuvre dans la lutte contre la maladie, consiste à combiner plusieurs méthodes. Obradovic propose une approche combinant l'utilisation des variétés résistantes avec des pratiques culturales propres, des bactéricides, des inducteurs de la SAR et des agents de biocontrôle (Obradovic *et al.*, 2004a). Des détails sur les caractéristiques des variétés de tomate ou de piment résistantes à la gale

bactérienne sont donnés plus loin dans le paragraphe 5.4 (Races et gènes d'avirulence chez les *Xanthomonas* spp. des Solanées).

4. Les agents pathogènes

4.1. Description

Les *Xanthomonas* spp. des Solanées sont des bacilles (0.7-1.0 x 2.0-2.4) gram-négatifs, appartenant à la classe des γ -Protéobactéries, au genre *Xanthomonas*, à la famille des Xanthomonadaceae et à l'ordre des Xanthomonadales. Elles sont aérobies strictes et possèdent un flagelle polaire unique. Sur agar nutritif, elles ont une croissance relativement lente et forment des colonies circulaires, lisses, muqueuses, fluides, jaunes et à bords entiers (Figure 1.11). La couleur jaune est due à la synthèse d'un pigment appelé xanthomonadine, présent chez toutes les espèces de *Xanthomonas* et qui aurait des propriétés antioxydantes et protectrices (Rajagopal *et al.*, 1997).



Figure 1.11 : colonies de *X. euvesicatoria*

4.2. Gamme d'hôtes

Conformément à ce qui est connu chez les *Xanthomonas*, le spectre d'hôtes des *Xanthomonas* spp. des Solanées à graines est étroit. Il est limité généralement à la tomate (*Solanum lycopersicum*) et aux *Capsicum* spp. (piment et poivron). D'une manière générale, la tomate et les *Capsicum* spp. (piment et poivron) sont sensibles aux espèces *X. euvesicatoria* et *X.*

gardneri (Bouzar *et al.*, 1994b; Jones *et al.*, 2000; Quezado-Duval *et al.*, 2004). Seule la tomate est sensible aux espèces *X. vesicatoria* et *X. perforans* (Bouzar *et al.*, 1994b; Jones *et al.*, 2000; Robbins *et al.*, 2009). Certaines espèces et cultivars de tomates et de piment sont résistants à la gale bactérienne mais cette résistance varie en fonction des différentes espèces du complexe *Xanthomonas* spp. des Solanées. Dans la plupart des cas, la résistance que développe la plante hôte vis-à-vis de l'agent pathogène est de type HR. Cependant, une résistance quantitative a été décrite dans certains cultivars de tomate et piment. D'autres Solanées, notamment des adventices, ont été décrites comme hôtes éventuels : *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *H. aureus*, *Lycium chinense*, *L. halimifolium*, *Nicotiana rustica*, *Physalis minima*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. rostratum*, *S. tuberosum*, *Nicandra physalodes*, et *S. melongena* (Blancard, 2009; Jones *et al.*, 1998). Le statut d'hôte de certaines de ces espèces est contesté car des essais d'inoculation artificielle ont montré qu'il s'agit plutôt de réactions d'hypersensibilité que de véritables infections (Jones *et al.*, 1998). En outre, à notre connaissance, à l'exception de la souche ICMP 7464 isolée de *Nicotiana tabacum* L., aucune autre souche de *Xanthomonas* spp. isolée d'une de ces espèces citées comme hôtes éventuels n'existe dans les collections internationales. Dans notre laboratoire, nous avons inoculé la souche ICMP 7464 (*X. campestris* pv. *vesicatoria*) sur des plants de *Nicotiana glauca* et aucune réaction n'a été observée (données non publiées). Des données AFLP et de pouvoir pathogène ont montré que cette souche n'appartenait à aucune des espèces responsables de la gale bactérienne.

4.3. La séquence du génome de *Xanthomonas euvesicatoria*

Parmi les espèces du complexe *Xanthomonas* spp. des Solanées, seul le génome de l'espèce *X. euvesicatoria* (souche 85-10) a été entièrement séquencé par une équipe allemande (Thieme *et al.*, 2005). Ce génome comprend un chromosome circulaire de 5,17 Mb (5 178 466 pb) et quatre plasmides pXCV2 (1 852 pb), pXCV19 (19 146 pb), pXCV38 (38 116 pb) et pXCV183 (182 572 pb). Le génome de *X. euvesicatoria* possède au total 4726 séquences codantes (CDS). La taille des régions codantes représente environ 87,13% de la taille du chromosome. L'origine de la réplication du chromosome se trouve dans le gène *dnaA* situé dans une région du chromosome où le contenu en G+C est altéré. Le codon d'initiation du gène *dnaA* est défini comme étant le point zéro du chromosome et la réplication se fait de façon bidirectionnelle à partir de ce point.

Le génome de *X. euvesicatoria* possède 66 séquences insertionnelles (IS) dont 58 sont localisées dans le chromosome et 8 dans les plasmides (Thieme *et al.*, 2005).. Soixante-deux de ces IS appartiennent aux familles IS3 (48 éléments), IS5 (10 éléments) et IS6 (10 éléments). Quatre IS de la souche 85-10 de *X. euvesicatoria* n'appartiennent à aucune des familles d'IS connues. Le génome de *X. euvesicatoria* possède des régions où le contenu en G+C est différent des autres régions du génome. Ainsi, la présence de telles régions et l'abondance des séquences insertionnelles suggèrent une très grande plasticité du génome de *X. euvesicatoria*.

Par ailleurs, la comparaison des séquences des protéines prédites de *X. axonopodis* pv. *citri* (souche 306), *X. campestris* pv. *campestris* (souche ATCC33913), *X. oryzae* pv. *oryzae* (souche MAFF311018) et *X. euvesicatoria* (souche 85-10) a montré que 2999 séquences codantes (CDS) sont des gènes orthologues qui représentent l'ossature conservée de ces 4 espèces (Thieme *et al.*, 2005). Cinq cent quarante huit CDS sont spécifiques à *X. euvesicatoria* et codent pour des protéines hypothétiques.

La comparaison de ces 4 espèces avec *X. albilineans* (souche GPE PC73) a révélé l'existence de 1256 CDS communes aux 5 souches (Pieretti *et al.*, 2009). Cependant les tailles des chromosomes de *X. euvesicatoria* (85-10) et *X. axonopodis* pv. *citri* (souche 306) sont plus grandes de 1,4 Mb que celle de *X. albilineans*. Dans le genre *Xanthomonas*, *X. euvesicatoria* est l'espèce qui possède le maximum de gènes ancestraux (2809 gènes) hérités de l'ancêtre commun des *Xanthomonas*. Aussi, la conservation de la synténie (ordre et contenu des gènes) entre les chromosomes de *X. euvesicatoria* souche 85-10 et *X. albilineans* souche GPE PC73 suggère que les événements de recombinaison entre les deux espèces se sont limités à la spéciation de *X. albilineans* (Pieretti *et al.*, 2009).

En outre, Yao *et al.* ont comparé les génomes de 6 souches de *Xanthomonas* séquencées notamment *X. euvesicatoria* souche 85-10, *X. campestris* pv. *campestris* souches ATCC33913 et 8004, *X. citri* pv. *citri* souche 306, *X. oryzae* pv. *oryzae* souches KACC10331 et MAFF311018 et ils ont mis en évidence 2754 gènes communs à toutes les souches et respectivement, 440, 24, 99, 388, 25 et 117 gènes spécifiques (Yao *et al.*, 2007).

La comparaison de 10 souches de *Xanthomonas* séquencées, *X. euvesicatoria* souche 85-10, *X. campestris* pv. *campestris* souches ATCC33913, 8004 et B100, *X. citri* pv. *citri* souche 306, *X. oryzae* pv. *oryzae* souches KACC10331, MAFF311018 et PXO99A, *X. campestris* pv.

armoraciae souche 756C et *X. oryzae* pv. *oryzicola* souche BLS 256 a montré que ses souches avaient 2156 CDS en commun (Tableau 1.4) (Blom *et al.*, 2009).

Chromosome	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> B100	<i>X. campestris</i> pv. ATCC3391	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8004	<i>X. campestris</i> pv. <i>amoraciae</i> 756C	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> 85 – 10	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> 306	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> 10331	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> 311018	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> BLS256
Taille (pb)	5079002	5076187	5148708	4941214	5178466	5175554	494143	494021	524007	483173
CDS	4471	4181	4273	4534	4487	4313	9	7	5	9
G+C%	65	65	64,9	65,3	64,6	64,8	4637	4372	5083	4554
plasmide	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0
Genes		5832	5079	4598	5229	5809	5805	5091	5083	4686

Tableau 1.4 : comparaison générale des génomes de 10 espèces de *Xanthomonas* séquencées (Blom *et al.*, 2009)

5. Infection de la plante par *Xanthomonas*

5.1. Entrée de la bactérie

Le processus infectieux des bactéries pathogènes commence par la rencontre de ces derniers avec leur plante hôte. Pour le cas des bactéries foliaires comme les *Xanthomonas*, pour que l'infection soit efficace, les bactéries doivent pouvoir coloniser la surface de la feuille puis, atteindre ensuite les sites de pénétration. Nous avons vu dans les paragraphes précédents l'importance de la phase épiphyte dans le processus infectieux. L'adhésion des bactéries à la surface de la feuille se fait au moyen des fimbriae (Romantschuk *et al.*, 1994). En outre, les pili empêchent le lessivage des bactéries de la surface des feuilles par l'eau de pluie et d'irrigation (Suoniemi *et al.*, 1995). Les exopolysaccharides (EPS) ainsi que les liposaccharides (LPS) extracellulaires favorisent aussi l'adhésion de la bactérie à son hôte (Jacques, 1996; Leben, 1981).

Non pourvues en enzymes capables de dégrader la cuticule, les bactéries sont incapables de traverser l'épiderme de façon active (Fett *et al.*, 1992). Ainsi, les bactéries pénètrent à l'intérieur de la plante à travers les stomates, les hydathodes, les lenticelles et les blessures (Rudolph, 1993). La pénétration des bactéries dans les tissus peut impliquer aussi bien des mécanismes passifs qu'actifs. En effet, l'entrée passive des bactéries à l'intérieur des tissus se fait par le phénomène d'entrée et de sortie de l'eau de respiration, de transpiration et de guttation (Rudolph, 1993). Des études récentes suggèrent qu'au cours du processus de co-évolution bactérie - plante hôte, les cellules stomatales ont acquis la capacité de détecter la

présence des bactéries et de provoquer la fermeture des stomates (Gudesblat *et al.*, 2009; Melotto *et al.*, 2008). Les bactéries peuvent aussi être attirées par chimiotactisme et nager vers les sites de pénétration (Rudolph, 1993). Ce phénomène semble être très important dans le processus de pénétration des espèces *X. campestris* pv. *campestris* et *X. campestris* pv. *citri* à l'intérieur des tissus et déterminé par le gène *mcp* (methyl-accepting chemotaxis) (Da Silva *et al.*, 2002). Les sites de pénétration varient suivant les espèces. Par exemple *X. campestris* pv. *cajani*, *X. campestris* pv. *manihotis* et *X. campestris* pv. *pruni* pénètrent dans leur plante hôte à travers les stomates (Rudolph, 1993). *X. campestris* pv. *campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* s'introduisent à l'intérieur des tissus à partir des hydathodes. Les *Xanthomonas* comme toutes les bactéries phytopathogènes peuvent aussi pénétrer à l'intérieur des plantes via les blessures occasionnées par les insectes ou par d'autres facteurs (pratiques culturales, vent...). *X. campestris* pv. *vesicatoria* pénètre dans les tissus via les stomates ou les blessures et se multiplie ensuite dans les espaces intercellulaires (Stall *et al.*, 1993).

5.2. Interactions entre plante et bactérie pathogène

Une fois dans les tissus végétaux, l'interaction entre la plante et la bactérie peut prendre deux aspects :

- la relation compatible : Elle se produit entre une plante hôte sensible et une bactérie virulente. La bactérie pénètre dans les espaces intercellulaires (puis les vaisseaux conducteurs pour certaines espèces) sans que la plante ne déclenche de mécanismes de défense. Les bactéries mettent alors en place des mécanismes leur permettant de détourner certains métabolites produits par les cellules végétales et qui sont nécessaires à leur multiplication, et suppriment les mécanismes de défense de la plante. Cette invasion de la plante par la bactérie se traduit également par l'apparition des symptômes.
- la relation incompatible dans laquelle la plante est capable de résister à l'infection bactérienne : il y a reconnaissance rapide de la présence de bactéries dans les tissus, déclenchement des mécanismes de défense qui se traduisent principalement par la réaction hypersensible (mort des cellules végétales à proximité du site d'infection). Lors de cette réaction, des molécules de défense sont libérées par les cellules végétales. L'absence de cellules vivantes à proximité (confinement des bactéries) ainsi que la présence des molécules de défense limite la multiplication bactérienne et

empêchent la formation de symptômes. La bactérie est considérée dans ce cas comme non virulente (ou avirulente).

Dans les deux cas, la bactérie met en place des mécanismes d'attaque et de suppression des réactions de défense de la plante tandis que celle-ci met en place des mécanismes de reconnaissance et de défense. L'interaction se fait au niveau moléculaire via les produits de gènes transcrits de manière constitutive ou spécialement induits lors de l'interaction.

Les plantes sont capables de détecter la présence d'agents pathogènes de deux façons (Jones & Dangl, 2006) : l'une utilise des récepteurs PRRs (transmembrane Pattern Recognition Receptors) qui reconnaissent les PAMPS ou MAMPS (Pathogen- ou Microbe- Associated Molecular Patterns) (Zipfel & Felix, 2005), qui sont des molécules communes à différentes classes d'agents microbiens (incluant des non pathogènes), comme la flagelline. Cette première réaction de défense ou PAMP-triggered Immunity (PTI) peut bloquer l'invasion de l'agent pathogène.

La deuxième voie se produit principalement à l'intérieur de la cellule, et met en jeu les gènes de résistance R, dont la majorité codent pour des protéines NB-LRR (protéines ayant la capacité de se lier à l'ADN –Nucleotide Binding - et possédant des régions riches en Leucine-Leucine Rich Repeat) et des effecteurs produits par l'agent pathogène et injectés directement dans la cellule hôte (effecteurs de type III, cf. paragraphes suivants). Il y a alors activation des réactions de défense de la plante ou Effector Triggered Immunity (ETI) lorsqu'il y a reconnaissance spécifique entre gène de résistance et effecteur. Dans le cas d'une réaction compatible, les effecteurs ne sont pas reconnus suffisamment rapidement par des gènes de résistance. Ils contribuent par ailleurs au pouvoir pathogène et peuvent interférer avec la réaction de défense PTI.

5.3. Les déterminants du pouvoir pathogène

La multiplication bactérienne se fait à partir des ressources trophiques végétales. Ces ressources sont soit séquestrées dans différents compartiments à l'intérieur de la cellule végétale, soit sous une forme chimique non directement utilisable par la bactérie. Les bactéries phytopathogènes ont développé un arsenal moléculaire leur permettant de mobiliser ces ressources à leur profit. Ces déterminants du pouvoir pathogène peuvent jouer un rôle plus

ou moins important dans les deux composantes du pouvoir pathogène : la virulence (aptitude à attaquer une plante ou non) et l'agressivité (quantité de maladie occasionnée).

a. Exopolysaccharide, enzymes hydrolytiques et toxines

Après la pénétration dans la plante, les bactéries vont se multiplier dans les espaces intercellulaires du mésophylle. La paroi de la cellule végétale représente, pour eux, une très importante réserve de substrat énergétique qu'elles exploitent par hydrolyse des composés cellulotiques et pectiques (Boucher *et al.*, 2001 ; Van Sluys *et al.*, 2002). Ainsi, la plupart des *Xanthomonas* secrètent des enzymes cellulolytiques et pectinolytiques. Ces enzymes ont été mises en évidence chez certaines souches de *X. campestris* pv. *vesicatoria*, toutefois elles ont un rôle mineur dans le pouvoir pathogène (Rudolph, 1993).

Tous les *Xanthomonas* secrètent des quantités importantes d'exopolysaccharides (EPS) en culture ou lors de leur multiplication dans la plante. Les exopolysaccharides sont un déterminant mineur de l'agressivité chez les *Xanthomonas*. Ils sont impliqués dans l'apparition des symptômes de water-soaking (tache huileuse). Ils agissent aussi en favorisant l'infection, par exemple en empêchant le contact direct entre l'agent pathogène et la paroi cellulaire des cellules végétales qui pourrait provoquer un déclenchement précoce des mécanismes de défense de la plante (Rudolph, 1993). Certaines espèces de *Xanthomonas* produisent des toxines qui jouent également un rôle dans les symptômes. A titre d'exemple, *X. albinea*s produit de l'albicidine qui joue un rôle important dans la symptomatologie mais sans influence sur la croissance bactérienne (Rott *et al.*, 1996). En général les toxines produites par les *Xanthomonas* provoquent des symptômes de type chlorose (Rudolph, 1993).

b. Lipopolysaccharides (LPS) et flagelline

Les lipopolysaccharides sont le composant majeur de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Ils sont formés de deux parties :

- Une partie interne, hautement conservée chez toutes les bactéries gram - et formée de lipide A et d'un noyau oligosaccharidique. Elle est l'éléciteur principal de l'immunité innée chez les mammifères et elle est désignée comme PAMPs ou MAMPs. Il a été démontré que cette partie de LPS joue le même rôle aussi dans les plantes (Dow *et al.*, 2000; Zeidler *et al.*, 2004)

- Une partie externe appelée antigène O, très variable en fonction des espèces et formée de longue chaîne de polysaccharides.

Les lipopolysaccharides pourraient aussi servir comme structure de barrière protégeant la bactérie contre les composants toxiques de défense de la plante. Par ailleurs, la flagelline, principale protéine constitutive du flagelle, joue aussi un rôle important dans le déclenchement des mécanismes de défenses de la plante hôte. Elle est constituée d'une région interne conservée qui abrite un peptide de 22aa (flg22) servant de MAMPS ou PAMPs, et d'une région externe variable qui est race-spécifique (Zipfel & Felix, 2005).

c. Quorum sensing (QS)

Le quorum sensing (QS) est défini comme étant la régulation de l'expression des gènes dépendant de la densité de la population bactérienne (von Bodman *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2001), il est le résultat d'une forme de communication entre cellules bactériennes est modulée par des molécules chimiques qu'elles secrètent dans le milieu (von Bodman *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2001). Chez les bactéries pathogènes des animaux et des plantes, le QS intervient dans la régulation de la synthèse de certains facteurs du pouvoir pathogène comme les exopolysaccharides et les enzymes extracellulaires. Des mutants QS de *X. campestris* pv. *campestris* sont moins agressifs que les souches sauvages (Chun *et al.*, 1997).

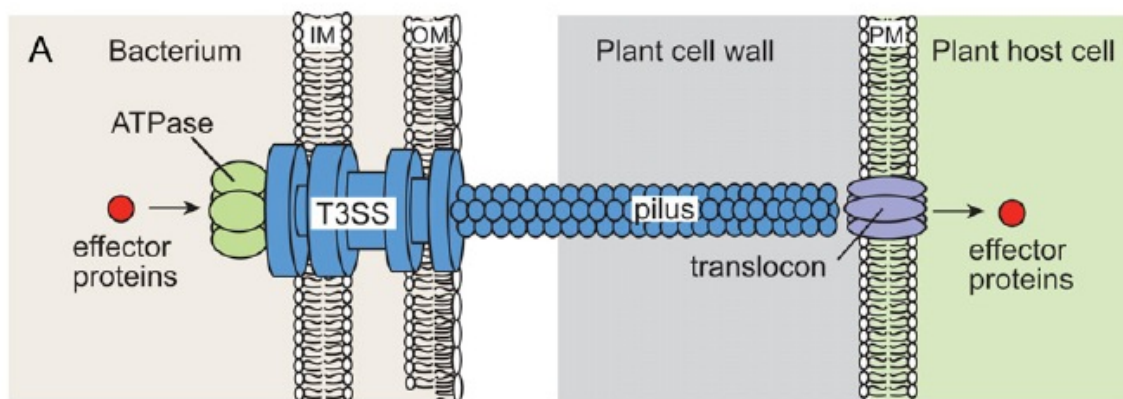
Beaucoup de bactéries gram - utilisent des dérivés N-acyl de l'homoserine lactone comme médiateur du QS (Whitehead *et al.*, 2001).. Néanmoins beaucoup de *Xanthomonas*, dont *X. campestris* pv. *vesicatoria*, ne produisent pas d'homoserine lactone. *X. campestris* pv. *campestris* produit le « diffusible signal factor » (DSF), acide gras α , β insaturé intervenant dans la régulation de la synthèse des enzymes extracellulaires, exopolysaccharides et glucanes cycliques et le « diffusible factor » (DF), une butyrolactone intervenant dans la régulation de la synthèse de la xanthomonadine et des exopolysaccharides (Chun *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004). Huit gènes (*rpfA* à *H*) sont impliqués dans la sécrétion du DSF et sont présents également chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (*X. euvesicatoria*) (Thieme *et al.*, 2005). Cette bactérie possède également un homologue du gène *pigB* impliqué dans la synthèse du DF chez *X. campestris* pv. *campestris*. La conservation de ces gènes dans *X. campestris* pv. *vesicatoria* suggère que l'expression de certains gènes impliqués dans l'agressivité, est également régulée par le QS (Thieme *et al.*, 2005).

d. Les effecteurs du système de sécrétion de type III

Dans les années 90 il a été montré que certains mutants de *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris* et d'*Erwinia amylovora* étaient incapables d'induire des symptômes sur des plantes sensibles et avaient également perdu la capacité à induire la réaction hypersensible sur des plantes résistantes ou non-hôtes (Boucher *et al.*, 2001). Les mutations provoquant ces phénotypes concernaient un ensemble de gènes qui a été appelé cluster *hrp* (pour *h*ypersensitive *r*esponse and *p*athogenicity) présent chez la plupart des bactéries phytopathogènes Gram – et chez certaines bactéries pathogènes d'animaux (Bogdanove *et al.*, 1996 ; Cornelis & Van Gijsegem, 2000). Les gènes *hrp* sont en général situés dans certaines régions potentiellement mobiles du génome appelées îlots de pathogénie (Gürlebeck *et al.*, 2006; Hacker & Kaper, 2000) ce qui suggère leur acquisition par transfert horizontal.

Chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*, le cluster *hrp* recouvre une région chromosomique de 23 kb organisée en six opérons nommés *hrpA* à *hrpF* (Bonas *et al.*, 2000; Buttner *et al.*, 2003). Les plus conservés parmi les bactéries pathogènes des animaux et des végétaux sont désignés *hrc* (pour *h*rp *c*onserved) (Bogdanove *et al.*, 1996 ; Gürlebeck *et al.*, 2006).

Le cluster de gènes *hrp* code pour les différentes protéines d'un système de sécrétion dit de type III (SST3) (Figure 1.12). Ce système de sécrétion permet aux bactéries d'injecter dans l'apoplaste ou le cytoplasme des cellules hôtes des facteurs du pouvoir pathogène dit « effecteurs de type III » (Alfano & Collmer, 2004; Boucher *et al.*, 2001; Cornelis & Van Gijsegem, 2000; Gürlebeck *et al.*, 2006; Hacker & Kaper, 2000; He *et al.*, 2004). L'injection directe des effecteurs dans le cytoplasme permet à ces derniers de ne pas être détectés par les Pattern Recognition Receptors (voir plus haut).



IM: Inner membrane

OM: Outer membrane

Figure 1.12 : représentation schématique du système de sécrétion de type III (SST3) chez les bactéries phytopathogènes

Le répertoire des effecteurs de type III est très divers et il est considéré comme étant la base moléculaire de la spécificité d'hôtes (Hajri *et al.*, 2009). Chez les *Xanthomonas*, environ une quarantaine de groupe d'effecteurs avérés ou potentiels ont été répertoriés (White *et al.*, 2009). Chez l'espèce *X. campestris* pv. *vesicatoria*, une vingtaine de protéines effectrices, dont 14 avérées et 6 candidats, ont été recensées (Tableau 1.5) (Thieme *et al.*, 2005). Presque tous ces effecteurs possèdent des homologues dans d'autres bactéries pathogènes hormis XopD et XopQ qui sont spécifiques à *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Hajri *et al.*, 2009).

Parmi ces effecteurs, certains comme XopX, sont des facteurs de virulence qui agissent directement en supprimant l'immunité innée de la plante. D'autres comme XopD sont des facteurs d'agressivité. Enfin, certains effecteurs ont une double fonction de virulence et d'avirulence comme AvrBs3.

N° de Gène	Gène	Commentaire(s) ^a	G+C%	Homologie ^b dans:					
				Xac	Xcc	Xoo	Pst	Rs	Eca
XCVd0104	avrBs1	fonction inconnue	42,23	-	+	-	-	-	-
XCV0052	avrBs2	Putative glycerophosphoryl-diester phosphodiesterase	63,59	+	+	+	-	-	-
XCV0471	avrRxv	famille YopJ/AvrRxv putative cysteine protease	52,32	-	(+)	-	-	+	-
XCV0581	xopB	Homologie avec HopD1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	55,54	-	-	-	+	-	-
XCV2435	xopC	fonction inconnue	47,5	-	-	-	-	(+)	-
XCV0437	xopD	SUMO cysteine protease; C48 family	54,76	-	+	-	-	-	-
XCV0414	xopF1	fonction inconnue	65,47	(+)	(+)	+	-	-	-
XCV2942	xopF2	fonction inconnue	64,72	(+)	(+)	+	-	-	-
XCV2156	xopJ	YopJ/AvrRxv family, putative cysteine protease	56,86	-	(+)	-	-	+	-
XCV2944	xopN	fonction inconnue	63,44	+	+	+	-	-	-
XCV1055	xopO	Homologie avec HopK1 et AvrRps4 (<i>P. syringae</i>)	52,04	-	-	-	+	-	-
XCV1236	xopP	fonction inconnue	61,66	+	+	+	-	+	-
XCV4438	xopQ	HopQ1-1 family protein, putative inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase	68,88	+	+	+	+	+	-
XCV0572	xopX	fonction inconnue	65,95	+	+	+	-	-	-
XCVd0105c		Homologie avec HopAO1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>); putative tyrosine phosphatase	49,39	-	+	-	+	-	-
XCV0294 ^c		Homologie avec HopX2 (<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>)	63,34	+	+	-	+	+	-
XCV1298 ^c		Homologie avec HopH1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	52,02	-	+	+	+	+	-
XCV2280 ^c		Homologie avec HopX2 (<i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>)	60,72	+	+	-	+	+	-
XCV3786 ^c		Homologie avec HopK1 (<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	60,36	(+)	-	-	+	-	-
XCV4428 ^c	avrRxol	Homologie avec AvrRxol (<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>)	50,77	-	-	-	-	-	-

^aFonction putative et homologie avec des effecteurs de type III présents chez *Pseudomonas syringae* ou d'autres *Xanthomonas*

^bHomologies déterminées par BLAST. -, absence d'homologie ; +, présence d'homologie ; (+), Homologie partielle ou avec une partie manquante chez le génome correspondant (*Xac*, *X. a.* pv. *citri* ; *Xcc*, *X. c.* pv. *campestris* ; *Xoo*, *X. o.* pv. *oryzae* ; *Pst*, *P. syringae* pv. *tomato* ; *Rs*, *R. solanacearum* ; *Eca*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*).

^cEffecteur de type III putatif, non vérifié expérimentalement.

Tableau 1.5 : caractéristiques des effecteurs de type III de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (souche 85-10) (Thieme *et al.*, 2005)

Les premiers effecteurs de type III ont été initialement identifiés pour leur rôle d'avirulence qui confirmait moléculairement la théorie de la relation gène pour gène introduit par Flor en 1942 (Flor, 1942) : le produit d'un gène d'avirulence bactérien dominant (*avr*) interagit avec le gène de résistance végétal correspondant (R) ou son produit pour déclencher la réaction hypersensible (Gürlebeck *et al.*, 2006). Actuellement, environ une quarantaine de gènes d'avirulence ont été identifiés chez des bactéries phytopathogènes comme *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Pantoea* et *Erwinia* (Gürlebeck *et al.*, 2006). Néanmoins, les gènes de résistance correspondant n'ont pu être tous identifiés. D'autres effecteurs de type III jouent un rôle dans l'agressivité ainsi que dans la capacité adaptative des bactéries (« fitness ») (Alfano & Collmer, 2004; Boch & Bonas, 2010). Enfin, nombre d'entre eux jouent un rôle à la fois dans la virulence et dans l'agressivité.

Les effecteurs de la famille AvrBs3

Chez *Xanthomonas*, le premier gène d'avirulence, *avrBs3* correspondant au gène de résistance BS3 a été isolé chez *X. campestris* pv. *vesicatoria* (Bonas *et al.*, 1989). Son rôle dans l'agressivité a été démontré en 2002 (Marois *et al.*, 2002). La protéine *avrBs3* est le chef de file d'une famille multigénique, la famille *avrBs3/pthA* qui n'est présente que chez *Xanthomonas* et *Ralstonia* (Gürlebeck *et al.*, 2006; Heuer *et al.*, 2007; Kay & Bonas, 2009). Les protéines de la famille AvrBs3/PthA se comportent, une fois dans la plante, comme des facteurs de transcription eucaryote d'où l'autre appellation de « effecteurs TAL » (pour « transcription activator-like ») (Kay & Bonas, 2009; White *et al.*, 2009).

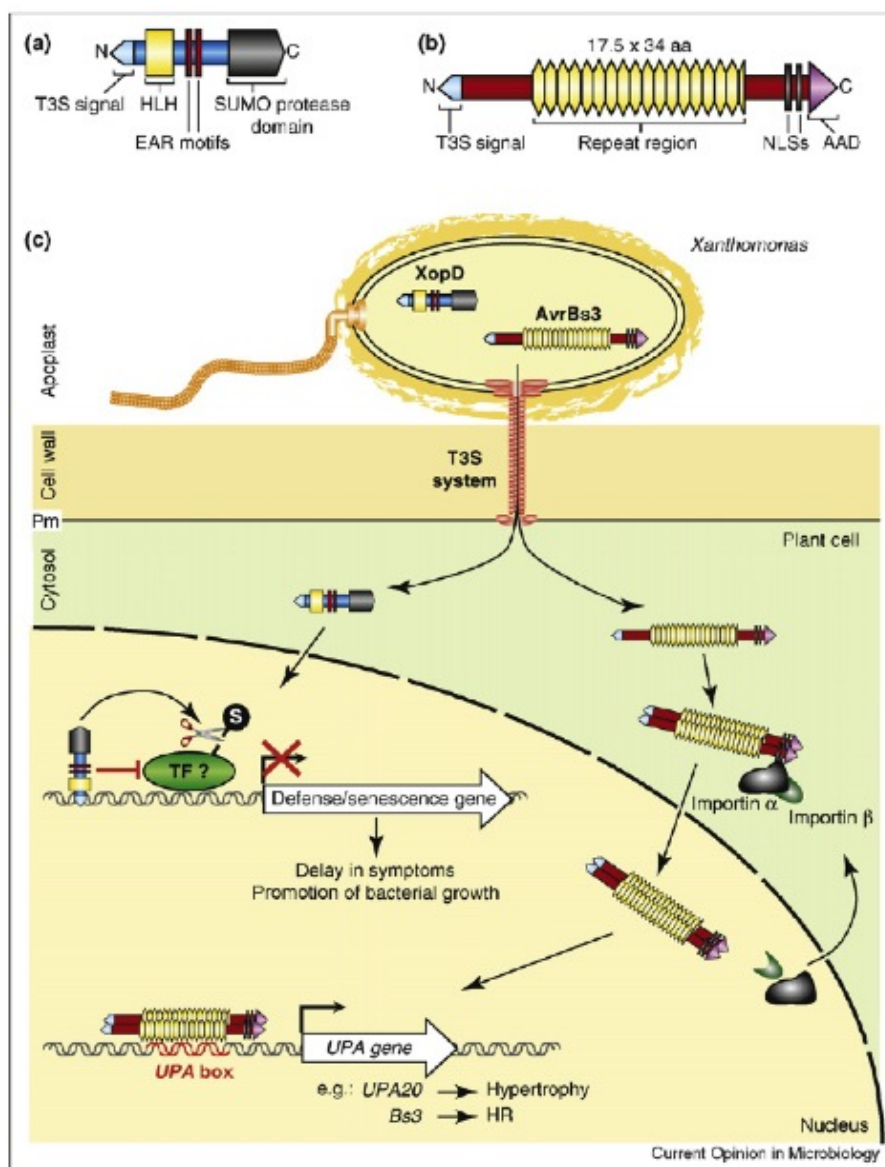
Les AvrBs3 sont des protéines comportant 3 régions : la région N-terminale est une région conservée contenant les signaux de translocation et de sécrétion par le SST3, la région C-terminale, également conservée, contient un domaine de signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un domaine d'activation de transcription (AD) requis respectivement, pour l'orientation de la protéine vers sa cible nucléaire et pour l'activation de gènes de l'hôte (Kay & Bonas, 2009; Schornack *et al.*, 2008). La région centrale est variable et contient des répétitions en tandem d'une unité de 34 aminoacides (Boch *et al.*, 2009; Gürlebeck *et al.*, 2006; Kay & Bonas, 2009; White *et al.*, 2009). Cette région est requise pour la liaison de l'effecteur avec les promoteurs des gènes de l'hôte (Boch *et al.*, 2009; Kay & Bonas, 2009). Le nombre de répétitions des motifs en tandem (qui varient pour les deux acides aminés en position 12 et 13) ainsi que leur agencement, sont déterminants dans la spécificité de liaison avec ces promoteurs, donc du type de gènes activés par le domaine AD et par conséquent de la réponse de l'interaction bactérie/hôte (Kay & Bonas, 2009).

Chez les plantes sensibles de piment, AvrBs3 induit l'expression de plus d'une dizaine de gènes de la plante, appelés *upa* (« upregulated » by AvrBs3) dont certains codent pour des expansines et des protéines habituellement induites par l'auxine (Figure 1.13), ainsi que d'autres facteurs de transcription appartenant à la famille des protéines basiques hélice-double-hélice (bHLH) qui vont eux-même activer d'autres gènes responsables de l'hypertrophie cellulaire (Boch & Bonas, 2010; Kay & Bonas, 2009; White *et al.*, 2009). L'hypertrophie des cellules du mésophylle causée par AvrBs3 est suivie, à un stade avancé de la maladie, d'une sortie massive de la bactérie vers la surface de la feuille et contribue ainsi à sa dissémination (Marois *et al.*, 2002; Wichmann & Bergelson, 2004). Chez les plantes

résistantes de poivron, AvrBs3 se fixe sur un promoteur du gène de résistance *Bs3* et l'active. Ainsi se déclenche une réponse d'hypersensibilité (HR) aboutissant à la mort cellulaire programmée des cellules aux abords de l'infection et par conséquent l'arrêt de la croissance bactérienne (Romer *et al.*, 2007).

XopD

XopD est un autre effecteur de type III identifié chez *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Il code pour une cystéine protéase qui agit comme un répresseur de la transcription de gènes de la plante liés à la sénescence et au système de défense, ce qui retarde l'apparition des symptômes comme chlorose et nécrose sur feuilles de tomate, et favorise la multiplication de la bactérie dans la cellule hôte (Figure 1.13) (Kay & Bonas, 2009; Kim *et al.*, 2008).



Modèle pour la fonction moléculaire des effecteurs de type III XopD et AvrBs3. La structure des protéines XopD et AvrBs3 sont décrites en (a) et (b), respectivement. Le mode d'action proposé est illustré en (c). Après translocation par le système de sécrétion de type 3, XopD est transporté dans le noyau de la cellule végétale où il s'attache non spécifiquement à l'ADN via un domaine hélice-tour-hélice non spécifique. Il est supposé que XopD inhibe des facteurs de transcription végétaux non encore identifiés. L'activité de XopD aboutit à la suppression l'expression de gènes associés à la défense et à la sénescence, conduisant à un retardement des symptômes de la maladie et à une augmentation de la multiplication bactérienne. AvrBs3 se dimérise dans le cytoplasme et interagit avec une importine (alpha) au niveau de son signal de localisation nucléaire. Une fois dans le noyau, AvrBs3 s'attache à une séquence spécifique de l'ADN, l'UPA box et active plus de 10 gènes UPA. UPA20, l'un des gènes induits est un régulateur central de l'hypertrophie cellulaire végétale. Chez les poivrons résistants, l'activation de Bs3 mène à la RH.

Figure 1.13 : mode d'action de AvrBs3 et XopD (Kay & Bonas, 2009)

XopX

Le gène *xopX* a été isolé chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et il est très conservé chez cette espèce et l'on trouve des homologues chez *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris* (Metz *et al.*, 2005). *XopX* est un facteur important du pouvoir pathogène puisqu'une perte de cet effecteur est associée à une réduction de l'agressivité de la bactérie sur plantes sensibles. De plus, à l'aide de tabacs transgéniques exprimant la protéine *XopX* et inoculés avec des bactéries normalement non pathogènes, il a été montré que *XopX* interagissait avec les mécanismes de défense innés de la plante et favorisait ainsi le pouvoir pathogène (expression de symptômes et croissance bactérienne dans la plante) (Metz *et al.*, 2005).

5.4. Races et gènes d'avirulence chez les *Xanthomonas* spp des Solanées

Certaines souches du complexe *Xanthomonas* spp des Solanées s'attaquent préférentiellement à des variétés de tomate ou de poivron. Cette différence de sensibilité est due à la présence d'un certain nombre de gènes d'avirulence chez ces souches interagissant avec des gènes de résistance chez les plantes hôtes (selon le modèle décrit ci-dessus) et elle est à la base de la définition des différentes races (Tableau 1.6). Ainsi, trois sources de résistance vis-à-vis de l'agent pathogène ont été identifiées chez différentes espèces du genre *Lycopersicon* (*Solanum*) (Astua-Monge *et al.*, 2000a; Astua-Monge *et al.*, 2000b; Jones & Scott, 1986; Scott *et al.*, 1995). La première, provenant de la variété Hawaii 7998, contient au moins trois gènes de résistance (*Rx1*, *Rx2*, *Rx3*), (Yu *et al.*, 1995) qui interagissent avec le gène *avrRxy* présent chez l'espèce *X. euvesicatoria* (Whalen *et al.*, 1993) et qui définit la race T1. La race T2 comprend des souches qui ne provoquent pas de réaction hypersensible sur la variété Hawaii 7998 (et il sera montré par la suite qu'elles provoquent des symptômes sur les deux variétés de tomate Bonny Best et H7981 et sur l'espèce *S. pennellii*) (Obradovic *et al.*, 2008). Ces souches T2 sont essentiellement représentées dans l'espèce *X. vesicatoria*. Les gènes *Rx1*, *Rx2*, *Rx3* n'ont jamais été transférés dans des variétés de tomate commerciales en raison de la prévalence des souches contournant cette résistance (Stall *et al.*, 2009). La deuxième source correspondant au gène de résistance *Xv3* a été identifiée dans *S. pimpinellifolium* et dans le cultivar Hawaii 7981. *Xv4* est la troisième source de résistance, et elle a été identifiée dans *S.*

pennellii. Les deux gènes *Xv3* et *Xv4* peuvent, interagir avec les gènes d'avirulence *avrXv3* et *avrXv4* présents chez l'espèce *X. perforans* en provoquant une HR (Astua-Monge *et al.*, 2000a; Astua-Monge *et al.*, 2000b; Jones *et al.*, 1995; Minsavage *et al.*, 1996). Les souches porteuses des gènes *avrXv3* et *avrXv4* appartiennent à la race T3. Cependant, les souches appartenant à la race T4 portent uniquement le gène *avrXv4*, d'où l'hypothèse selon laquelle les souches de la race T4 seraient des mutants T3 (Minsavage *et al.*, 2003; Stall *et al.*, 2009). Les gènes *avrRxv* et *avrXv4* appartiennent à la famille *YopJ*. Les trois gènes *avrRxv*, *avrXv3* et *avrXv4* sont portés par le chromosome.

Par ailleurs, le gène *avrBs4*, isolé des souches piment peut provoquer une HR, aussi bien chez la tomate que chez le piment. Il existe donc deux gènes *Bs4*, l'un porté par des plants de tomate et l'autre par des plants de piment (*C. pubescens*) (Ballvora *et al.*, 2001; Sahin & Miller, 1998). Le lien entre ces deux gènes reste à déterminer. Le gène *Bs4* de la tomate appartient à la classe des NBS-LRR et il est porté par un plasmide (Schornack *et al.*, 2004; Stall *et al.*, 2009).

Races	Gènes de résistance		
	<i>rx1, rx2, rx3</i>	<i>Xv3</i>	<i>Xv4</i>
T1	HR ^a	S	S
T2	S ^b	S	S
T3	S	HR	HR
T4	S	S	HR

^a Hypersensible ^b Sensible

Tableau 1.6 : réactions des différentes races de *Xanthomonas* spp. des Solanées avec les gènes de résistance de la tomate (Stall *et al.*, 2009)

En outre, des travaux ont mis en évidence l'existence d'une autre forme de résistance dite « quantitative » chez certaines variétés de tomates. A titre d'exemple l'accession PI 114490 est résistante aux 3 races T1, T2 et T3 (Stall *et al.*, 2009). Cette résistance se caractérise par une réduction de la taille et du nombre des symptômes. Des variétés portant ce type de résistance sont déjà sur le marché.

Chez les *Xanthomonas* spp pathogènes des espèces du genre *Capsicum*, cinq gènes d'avirulence ont été identifiés. Quatre de ces gènes ont été décelés sur *X. euvesicatoria* : *avrBs1*, *avrBs2*, *avrBs3* et *avrBs4* (Bonas *et al.*, 1989; Minsavage *et al.*, 1990; Ronald & Staskawicz, 1988; Sahin & Miller, 1998). Ces gènes interagissent respectivement avec les

gènes de résistance *Bs1*, *Bs2*, *Bs3* et *Bs4* présents respectivement dans *C. annum* (PI163192), *C. chacoense*, *C. annum* (PI271322) et *C. pubescens* (Cook & Stall, 1963; Cook & Guevara, 1984; Kim & Hartmann, 1985; Sahin & Miller, 1998) (Tableau 1.7). Seul le gène *avrBs3* est porté par le chromosome, les trois autres sont portés par des plasmides (Stall *et al.*, 2009). Ces gènes peuvent subir des mutations qui peuvent conduire à une perte de leur activité. Par exemple l'insertion de l'*IS476* dans le gène *avrBs1* lui confère une activité virulente sur des plantes porteuses du gène *Bs1* (Kearney & Staskawicz, 1990). La fréquence des mutations dans le gène *avrBs1* est très élevée (4.10^{-4} mutants/cellules/division), par conséquent aucun cultivar avec le gène *Bs1* n'a été commercialisé (Kearney & Staskawicz, 1990; Stall *et al.*, 2009). Le gène *avrBs2* joue un rôle important dans la capacité adaptative « fitness » de la bactérie (Gassmann *et al.*, 2000; Stall *et al.*, 2009). Quatre mutations majeures peuvent se produire dans le gène *avrBs2*, une insertion - délétion de 5pb et deux mutations ponctuelles dans les positions 1386 et 1407. Dans toutes ces mutations, exceptée la mutation en position 1387, la perte de la fonction avirulente du gène *avrBs2* s'accompagne d'une diminution de l'agressivité de la bactérie sur plantes sensibles (Gassmann *et al.*, 2000; Stall *et al.*, 2009). Des cultivars de poivrons portant le gène *Bs2* ont été commercialisés pendant quelques années (6-7 ans). Aucun cultivar portant individuellement les gènes *Bs3* et *Bs4* n'a été commercialisé. Le dernier gène identifié chez les souches pathogènes de *Capsicum spp.* est le gène *avrHah1*. Il a été découvert en 2008, par Schornack *et al.*, chez l'espèce *X. gardneri* et il appartient à la famille des *avrBs3* (Schornack *et al.*, 2008). Il serait le premier à être décrit chez cette espèce. Des lignées isogéniques nommées ECW10R, ECW20R et ECW30R portant les gènes *Bs1*, *Bs2* et *Bs3* sont utilisés pour l'évaluation des différentes races de *Xanthomonas spp.* des piments (Jones *et al.*, 1998; Stall *et al.*, 2009).

Races	Gènes de resistance			
	<i>Bs1</i>	<i>Bs2</i>	<i>Bs3</i>	<i>Bs4</i>
0	HR ^a	HR	HR	HR
1	S ^b	HR	HR	HR
2	HR	HR	S	S
3	S	HR	S	HR
4	S	S	HR	HR
5	HR	S	S	S
6	S	S	S	HR
7	S	HR	HR	S
8	S	HR	S	S
9	S	S	HR	S
10	S	S	S	S

^a Hypersensible ^b Sensible

Tableau 1.7 : réactions des différentes races de *Xanthomonas euvesicatoria* avec les gènes de résistance des piments (Stall *et al.*, 2009)

Par ailleurs, le gène *avrBsT* isolé des souches pathogènes de tomate peut provoquer une réaction de type HR sur des plants de piment portant le gène *BsT* correspondant (Minsavage *et al.*, 1990). Le gène *avrBsT* est porté par un plasmide et il appartient à la famille *YopJ*.

En outre, au champ, aucun des cultivars portant un des gènes *Bs1*, *Bs2*, *Bs3* ou *Bs4* ne peut résister à toutes les races de *Xanthomonas ssp.* pathogènes des *Capsicum spp.* (Kousik & Ritchie, 1998; Stall *et al.*, 2009). L'amélioration variétale s'oriente donc vers la résistance pyramidale. A titre d'exemple, les souches de la race 6 sont pathogènes des plants portant un des gènes *Bs1*, *Bs2* ou *Bs3*. Des travaux ont montré que des plants de poivron auxquels on a transféré les 3 gènes *Bs1*, *Bs2* et *Bs3* sont moins affectés par la maladie que les variétés portant un seul des gènes de résistance (Kousik & Ritchie, 1998; Stall *et al.*, 2009).

Outre la résistance de type HR, une résistance dite « quantitative » a été détectée chez *C. annuum* et deux gènes récessifs *bs5* et *bs6* sont identifiés comme en étant responsables (Jones *et al.*, 2002). Certaines compagnies de semences commencent à commercialiser des cultivars de piment contenant ces 2 gènes (Stall *et al.*, 2009). Le Tableau 1.8 ci-dessous dresse un récapitulatif des différentes accessions de piment et de tomate résistantes ainsi que des effecteurs bactériens interagissant avec les différents gènes de résistance.

	Plante		Bactérie	
	Source	Espèce	Effecteur	Localisation
Piment				
<i>Bs1</i>	PI 163192	<i>C.^a annuum</i>	AvrBs1	Plasmide
<i>Bs2</i>	PI 260435	<i>C. chacoense</i>	AvrBs2	Chromosome
<i>Bs3</i>	PI 271322	<i>C. annuum</i>	AvrBs3	Plasmide
<i>Bs4</i>	PI 235047	<i>C. pubescens</i>	AvrBs4	Plasmide
<i>Bs5</i>	PI 163192/PI 271322	<i>C. annuum</i>	ND ^c	ND
<i>Bs6</i>	PI 163192/PI 271322	<i>C. annuum</i>	ND	ND
<i>BsT</i>	Piment commercial	<i>C. annuum</i>	AvrBsT	Plasmide
Tomate				
<i>rx1</i> , <i>rx2</i> , <i>rx3</i>	Hawaii 7988	<i>S.^b lycopersicum</i>	AvrRxv	Chromosome
<i>Xv3</i>	PI 128216 & Hawaii 7981	<i>S. pimpinellifolium</i> & <i>S. lycopersicum</i>	AvrXv3	Chromosome
<i>Xv4</i>	716	<i>S. penellii</i>	AvrXv4	Chromosome
<i>Bs4</i>	Tomate commerciale	<i>S. lycopersicum</i>	AvrBs4	Plasmide

^a *Capsicum*, ^b *Solanum*, ^c Non déterminé

Tableau 1.8 : sources de résistances sur tomate et piment et effecteurs bactériens correspondants

6. Le diagnostic de la gale bactérienne des Solanacees

6.1. Rappel sur les méthodes de diagnostic des bactéries phytopathogènes

Des nombreux agents pathogènes comme les bactéries s'attaquent aux végétaux et provoquent des symptômes divers (chlorose, nécrose, mosaïque, tumeur...) dans les différentes parties de la plante (feuilles, tiges, racines, fruits...). Les dégâts causés par ces agents pathogènes peuvent entraîner des pertes de rendement considérables chez les plantes cultivées (Lopez *et al.*, 2006). Chez les arbres fruitiers, des épidémies peuvent affecter des vergers entiers pendant plusieurs années. Néanmoins, la perte des rendements et l'impact économique sont moins importants tant que le niveau des épidémies est faible. Actuellement avec la globalisation du commerce, on assiste à une globalisation des agents phytopathogènes et les dommages causés par ces derniers deviennent de plus en plus importants (De Boer *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2006). Par ailleurs, la menace de l'utilisation des agents phytopathogènes dans le bioterrorisme est réelle, notamment aux USA depuis les attaques à l'anthrax contre des civils en 2001 (Schaad *et al.*, 2003). Aux Etats-Unis, les pertes que pourrait occasionner l'introduction accidentelle ou volontaire d'un organisme de quarantaine sont estimées à peu près à 10 milliards de dollars (Schaad *et al.*, 2003). Par ailleurs, il n'existe aucun traitement chimique contre les virus et les produits chimiques utilisés contre les bactéries dans les champs et sous serre sont peu efficaces (Lopez *et al.*, 2006). Ainsi, les programmes de lutte intégrée contre ces agents phytopathogènes sont basés principalement sur la prévention (Alvarez, 2004; Lopez *et al.*, 2006). La mise en place de telles mesures fait appel à des méthodes de diagnostic sensibles, spécifiques et fiables. Sous le terme diagnostic, se trouvent en fait deux paramètres qui sont complémentaires, l'identification et la détection. L'identification est la détermination de l'agent responsable des symptômes de la maladie observée chez une plante. Le terme détection fait référence à la recherche d'un agent pathogène donné dans les tissus ou les organes de la plante (Lepoivre, 2003). Comme la plupart des maladies bactériennes se transmettent via les semences et le matériel végétal, la détection d'agents pathogènes sur ces produits est d'une importance capitale surtout au niveau des échanges internationaux (Alvarez, 2004). En cas d'infection d'un champ ou d'un verger, les résultats des tests de diagnostic sont indispensables avant tout traitement ou la mise en place d'un schéma d'éradication (Lopez *et al.*, 2006).

Différentes méthodes existent pour la détection des bactéries dans les semences, fruits, matériel végétal destiné à la plantation, ou tout autres réservoirs. Parmi elles se trouvent des méthodes classiques qui comprennent une première étape d'isolement puis la caractérisation de la bactérie basée sur des critères morphologiques et biochimiques. Cependant, ces méthodes ne sont pas toujours sensibles, spécifiques et requièrent beaucoup de temps, environ 10 à 20 jours avant d'avoir les résultats (Alvarez, 2004; Lopez *et al.*, 2006; Schaad *et al.*, 2003; Ward *et al.*, 2004). Ces méthodes sont peu reproductibles et ne sont pas adaptées à l'analyse en routine d'un grand nombre d'échantillons (Lopez *et al.*, 2006). Des méthodes sérologiques ont vu le jour dans les années 1970 pour la détection des virus, et ont été appliquées également au diagnostic des bactérioses. Nous verrons plus loin que ces méthodes ne présentent pas toujours la sensibilité ni la spécificité attendues, mais elles sont par contre adaptées au traitement de grands nombres d'échantillons. Depuis les années 1980, on assiste à l'essor de la biologie moléculaire et notamment au développement de méthodes basées sur l'amplification génique, et l'hybridation. Ces méthodes ont révolutionné le diagnostic car elles sont sensibles, spécifiques et procurent en général des réponses rapides. Depuis les années 2000, sont apparues les puces à ADN qui offrent des perspectives importantes en termes de génomique comparative et d'études de transcriptome. Nous verrons plus loin que leur utilisation dans le diagnostic médical a déjà fait ses preuves et que quelques applications existent déjà dans le domaine de la phytopathologie. Toutefois, ces méthodes moléculaires de détection ne remplacent pas systématiquement les méthodes conventionnelles. Ainsi, chaque nouvelle technique de diagnostic basée sur l'amplification de l'ADN, doit être comparée avec les méthodes conventionnelles, validée et standardisée avant d'être utilisée en routine (Alvarez, 2004; Janse, 2005; Martin *et al.*, 2000). Une étape importante dans l'élaboration d'un diagnostic est la vérification du pouvoir pathogène de l'agent isolé. On procède alors à des inoculations de la plante hôte en conditions contrôlées. Cette étape est surtout importante lorsque l'on décrit un nouveau pathogène sur une plante, ou encore l'introduction nouvelle d'un agent pathogène dans une région donnée. Il est alors important de vérifier le postulat de Koch.

Actuellement, la tendance va plutôt vers une approche intégrée ou polyphasique incluant les méthodes conventionnelle, sérologique et moléculaire pour la détection des organismes de quarantaine notamment les virus et les bactéries (Alvarez, 2004; Janse, 2005; Lopez *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2005). A titre d'exemple, cette approche est déjà officialisée dans l'Union

Européenne pour le diagnostic de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Directive 93/85/EEC), de *Ralstonia Solanacearum* (Directive 98/57/EC) et de *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*. Aussi, cette même approche a été utilisée pour la détection de *Erwinia amylovora* et de *X. fragariae* pour l'évaluation de plusieurs techniques par « ring test » dans le cadre du projet DIAGPRO (pour « Développement of diagnostic protocol for organisms harmful to plants ») de l'UE (Janse, 2005; Lopez *et al.*, 2005).

Nous développerons dans les paragraphes suivants les méthodes les plus utilisées dans le domaine de la bactériologie, qui sont les méthodes basées sur la sérologie et la biologie moléculaire.

6.2. Les méthodes sérologiques

Ces méthodes ont été développées au départ pour la détection des virus qui ne sont pas cultivables mais depuis les années 70, elles sont utilisées aussi pour la détection des bactéries (Schaad *et al.*, 2003). Le principe de ces méthodes est basé sur la réaction antigène anticorps. En effet, une grande variété de molécules antigéniques incluant des protéines, lipopolysaccharides et exopolysaccharides, est présente à la surface des cellules bactériennes (Alvarez, 2004). Ce sont souvent des éléments de la paroi (LPS, antigène O), ou encore des protéines constitutives des flagelles. Ces antigènes peuvent être la cible de différents anticorps monoclonaux (ou Mab) et polyclonaux. Les anticorps polyclonaux sont constitués d'un mélange d'anticorps dirigés contre différents épitopes (sites antigéniques) de la bactérie, alors que les anticorps monoclonaux sont dirigés contre un seul épitope. Les anticorps polyclonaux manquent parfois de spécificité, avec des réactions croisées entre différents taxons. A l'inverse, les anticorps monoclonaux ont parfois une couverture trop étroite. Par exemple, dans le cas d'*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, il existe une diversité sérologique et toutes les souches du taxon ne réagissent pas avec le même Mab (Alvarez, 2004; De Boer & McNaughton, 1987).

Ces méthodes sérologiques peuvent être utilisées pour détecter la bactérie directement dans les tissus végétaux. On peut également les utiliser pour identifier une bactérie isolée sur milieu de culture gélosé. Les méthodes d'immunodiagnostic permettent un gain de temps, cependant les résultats sont à prendre avec précaution en raison de la présence possible, comme nous l'avons vu, de faux positifs et négatifs (Schaad *et al.*, 2003). Par ailleurs des tests d'immunodiagnostic pour les principales bactéries pathogènes de tomate, pomme de terre et

d'autres plantes parmi les plus cultivées, sont commercialisés sous forme de kits. Cependant, ces kits ne sont efficaces que pour des échantillons présentant déjà des symptômes de la maladie diagnostiquée (Lopez *et al.*, 2006). Plusieurs techniques sont utilisées en immunodiagnostic notamment la technique ELISA (pour « Enzyme-linked immunosorbent assay »), l'Immunofluorescence (IF), le Lateral Flow device, la Cytométrie en flux et la séparation immuno-magnétique

a. ELISA

Le principe de cette méthode consiste à révéler l'interaction anticorps-antigène à l'aide d'enzymes gouvernant une réaction colorée, qui est quantifiable spectrophotométriquement. Deux approches sont fréquemment utilisées, la Das-Elisa (pour « Double Antibody Sandwich ») et la Tas-Elisa (Pour « Triple Antibody Sandwich »). La Das-Elisa est la méthode la plus couramment utilisée et elle a une sensibilité de 10^5 - 10^6 ufc/ml (Lopez *et al.*, 2005). Plusieurs modèles de kit Das-Elisa pour la détection d'une ou de plusieurs espèces bactériennes en même temps (multiplex ELISA) sont déjà commercialisés (Alvarez, 2004; Lopez *et al.*, 2005). A titre d'exemple un kit ELISA pour la détection de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* et de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* est déjà commercialisé. L'avantage de la méthode ELISA est qu'elle est bien adaptée à l'analyse d'un nombre important d'échantillons et qu'elle peut être automatisée. Elle est par conséquent une méthode sérologique très utilisée en diagnostic.

b. Immunofluorescence

Le principe de cette méthode consiste à visualiser au microscope un complexe antigène-anticorps à l'aide d'une immunoglobuline rendue fluorescente par le biais d'un fluorochrome (comme la fluorescéine). L'immunofluorescence est dite directe lorsque l'antigène réagit directement avec l'anticorps fluorescent et elle est dite indirecte lorsque l'anticorps fluorescent n'est pas spécifique de l'antigène mais d'une immunoglobuline anti-antigène. Cette méthode est utilisée surtout pour la détection des bactéries dans les semences et les tubercules (Schaad *et al.*, 2003). Elle est sensible et spécifique (10^5 bact/ml) mais relativement longue et pas toujours facile à interpréter (Lopez *et al.*, 2005). C'est la méthode utilisée en Europe pour la détection des bactéries dans les semences et le matériel végétal destiné à la plantation (Alvarez, 2004). En France, l'immunofluorescence est utilisée entre

autres pour la détection de *C. michiganensis* subsp *michiganensis* dans les semences de tomates.

c. Lateral Flow Device (LFD)

Cette technique est basée sur les principes de l'ELISA et de l'immunochromatographie qui consiste en la migration de nano ou microparticules le long d'une membrane. En effet des anticorps spécifiques sont fixés uniformément sur une membrane. L'échantillon est placé à une extrémité de la membrane et des microbilles (comme de l'or colloïdal, latex ou silice) conjuguées à un anticorps sont appliquées. L'anticorps se combine avec le complexe microbilles-antigènes puis il est fixé par le deuxième anticorps qui est sur la membrane. Au fur et à mesure que les antigènes sont capturés, la concentration en microparticules augmente et la réaction est alors facilement visualisée (Danks & Barker, 2000). Un kit LFD a permis la détection de *R. solanacearum* en 3 minutes (Alvarez, 2004). Des kits multiplex LFD sont également commercialisés par certaines sociétés. A titre d'exemple un kit multiplex LFD a été développé pour la détection concomitante de *R. solanacearum*, *C. michiganensis* subsp *michiganensis* et *X. hortorum* pv. *pelargonii* (Alvarez, 2004).

6.3. Les méthodes moléculaires

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la plupart des méthodes sérologiques ne permettent l'identification des bactéries que sur des échantillons présentant des symptômes. Or, les semences et le matériel végétal destiné à la plantation ne présentent généralement pas des symptômes. Par ailleurs certaines bactéries phytopathogènes existent sous forme viable et non cultivable (VNC) et ne peuvent pas être détectées par les méthodes de diagnostic conventionnelles qui nécessitent l'isolement de la bactérie (Lopez *et al.*, 2006). Deux grands types de méthodes sont utilisés dans le domaine du diagnostic moléculaire, les méthodes basées sur l'amplification génique et les méthodes basées sur l'hybridation. Dans les deux cas, la détection de l'agent pathogène repose sur la reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique de cet agent.

a. Méthodes basées sur l'amplification génique

PCR

Basée sur l'amplification d'une séquence spécifique de nucléotide *in vitro*, cette technique est utilisée pour la première fois pour la détection d'agent phytopathogène en 1989 (Puchta & Sanger, 1989). Depuis, la technique est utilisée pour la détection des principales bactéries phytopathogènes (Alvarez, 2004; Lopez *et al.*, 2006; Louws *et al.*, 1999). C'est une technique de détection rapide, spécifique et sensible (10^3 - 10^4 bact/ml). Elle est utilisée en routine pour la détection des bactéries (Lopez *et al.*, 2006) et peut être couplée à d'autres techniques comme l'ELISA (PCR-ELISA). L'efficacité de la PCR dépend de plusieurs paramètres comme la spécificité des amorces, la qualité de la polymérase, la composition et la stabilité du tampon, la pureté et la concentration des dNTPs, le paramétrage des cycles, les caractéristiques de la matrice initiale ainsi que la qualité de l'ADN à amplifier (Lopez *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2009).

Nested PCR (PCR nichée)

Le principe de cette technique repose sur une réaction d'amplification au cours de laquelle le produit d'une première PCR sert de matrice pour une deuxième PCR. En d'autres termes, le produit de la première réaction PCR est de nouveau amplifié à l'aide d'un second couple d'amorce qui s'hybride à une partie interne (nested ou nichée) de la séquence amplifiée. La sensibilité de la méthode est de 10^2 bact/ml (Lopez *et al.*, 2009). Cependant, le déroulement des deux PCR dans deux tubes différents augmente les risques de contamination. Ainsi, pour résoudre ce problème, certains auteurs ont proposé la nested PCR en un seul tube ou « one-tube » ou « single tube nested PCR » pour la détection de certains virus et bactéries des plantes (Bertolini *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2004). La limite de cette technique est de trouver les bonnes proportions entre les amorces externes et les amorces internes afin d'éviter que les amorces de la première réaction n'interfèrent pas avec la deuxième PCR (Lopez *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2009).

PCR compétitive

La PCR compétitive est basée sur la co-amplification à l'aide des mêmes amorces et au sein d'un même tube, de l'acide nucléique (ARN ou ADN) extrait d'un échantillon à quantifier et d'un acide nucléique titré, de même nature et de séquence proche, faisant office de standard

interne (Ameziane *et al.*, 2005). Cette technique a déjà utilisée en phytopathologie, par exemple pour la détection et la quantification de *C. michiganensis* susp. *sepedonicus* (Hu *et al.*, 1995). Elle est néanmoins maintenant remplacée par la technique de PCR quantitative en temps réel.

Multiplex PCR

Cette technique est basée sur la détection simultanée de deux ou plusieurs ADN et/ou ARN cibles, par une réaction PCR (multiplex PCR) utilisant plusieurs amorces spécifiques mélangées dans un seul et même mix. La multiplex PCR est très utile en phytodiagnostic dans la mesure où plusieurs bactéries et/ou virus peuvent infecter la même plante. Elle peut donc être utilisée pour vérifier la présence de plusieurs agents pathogènes dans le même matériel végétal en utilisant plusieurs amorces spécifiques ou pour détecter des virus apparentés dans différents hôtes (Lopez *et al.*, 2006; Louws *et al.*, 1999). Cette technique est déjà utilisée pour la détection simultanée de certaines bactéries phytopathogènes comme *R. solanacearum* et *X. campestris* pv. *pelargonii* dans le géranium (Glick *et al.*, 2002), ainsi que *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* et *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* dans la canne à sucre (Fegan *et al.*, 1998) et aussi pour la détection concomitante de six virus attaquant l'olivier (Bertolini *et al.*, 2001). La multiplex PCR est utilisée aussi pour amplifier en même temps que l'ADN (ARN) cible, un fragment d'ADN témoin pour s'assurer du bon déroulement de la PCR (De Boer *et al.*, 2007). La sensibilité de la méthode peut être influencée par la concentration des différentes amorces dans le milieu réactionnel (De Boer *et al.*, 2007).

La multiplex nested PCR qui est une combinaison de la multiplex PCR et de la nested PCR, permet d'améliorer la sensibilité et la fiabilité de la technique. Elle permet aussi un gain de temps et une réduction des coûts, dans la mesure où elle peut être réalisée dans un seul tube (Lopez *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2009). Cette technique est déjà utilisée pour la détection simultanée, dans l'olivier, de quatre virus à ARN et de *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (Bertolini *et al.*, 2003). Une multiplex nested PCR a également été développée pour détecter l'ensemble des souches de *X. axonopodis* pv. *allii*, agent du dépérissement bactérien des alliées (Robène-Soustrade *et al.*, 2010).

PCR en temps réel (Real-time PCR)

Contrairement aux autres méthodes PCR où les étapes d'amplification et d'analyse sont séparées, la PCR en temps réel combine les deux étapes. Le principe de cette technique est basé sur la détection et la quantification d'un signal fluorescent émis par un fluorophore dont l'intensité d'émission est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés pendant la PCR. La détection quantitative des amplicons se fait suivants deux principes généraux : les agents capables de se lier à l'ADN double brin genre « Sybr® Green I » et les sondes fluorescentes (Poitras & Houde, 2002). Il existe quatre principales technologies de sondes fluorescentes : hydrolyse de sondes (TaqMan® assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers). La technologie des sondes hydrolyse (TaqMan® assay) est la plus utilisée. Elle s'est avérée plus efficace que la technologie des agents intercalants en terme de spécificité et au niveau du multiplexage (Poitras & Houde, 2002). Ces différentes méthodes de détection ont une sensibilité équivalente. La technique est dotée d'une grande sensibilité et spécificité comparée aux autres techniques de PCR usuelles. Parmi les avantages de cette technique, on peut citer sa rapidité (30-60min pour amplifier 25 à 30 cycles), une capacité d'analyse qualitative et quantitative des acides nucléiques, une réduction considérable des risques de contamination en raison de l'absence des manipulations post-PCR, une grande capacité de multiplexage et permet une analyse à haut débit (Ameziane *et al.*, 2005; Schaad & Frederick, 2002). Cette technique a été proposée pour la détection de plusieurs bactéries phytopathogènes notamment *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Schaad *et al.*, 1999), *X. fragariae* (Vandroemme *et al.*, 2008), *X. axonopodis* pv. *citri* (Cubero & Graham, 2005; Mavrodieva *et al.*, 2004). En format multiplex, elle a été utilisée pour la détection et la caractérisation de nombreuses bactéries (Berg *et al.*, 2006) et virus (Kogovsek *et al.*, 2008). Des appareils portables de PCR temps réel sont actuellement disponibles pour des analyses de terrain. On peut citer à titre d'exemple l'appareil RAPID (pour Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device) développé par Idaho Technologie, d'une capacité d'analyse de 32 échantillons (Mumford *et al.*, 2006).

Technique LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

Développée par Notomi *et al.* en 2000, la technique LAMP est basée sur l'amplification d'acide nucléique à partir de 4 amorces spécifiquement conçues pour reconnaître six zones (séquences) différentes de l'ADN cible et une ADN polymérase doté d'une activité de

déplacement du brin (Notomi *et al.*, 2000). La réaction d'amplification se déroule à une température constante (60-65°C) pendant 1H. La technique est très sensible et moins onéreuse car elle ne nécessite pas l'utilisation d'un thermocycleur. L'utilisation des amorces en forme d'épingle de cheveux permet d'augmenter la sensibilité de la technique et de réduire le temps de la réaction (Nagamine *et al.*, 2002). La révélation des produits d'amplification ne requiert pas de migration sur gel. Elle peut se faire par turbidimétrie ou par détection colorimétrique utilisant un agent intercalant (SYBR Green I) ou l'hydroxy naphthol blue (HNB) (Notomi *et al.*, 2000); (Goto *et al.*, 2009). Une LAMP a été développée pour la détection de *X. axonopodis* pv. *citri* (Rigano *et al.*, 2010)

Autres techniques

D'autres techniques utilisées en diagnostic bactérien, combinent la PCR avec une méthode sérologique et permettent ainsi une meilleure sensibilité et un gain de temps. On peut citer à titre d'exemple, l'immunocapture-PCR (IC-PCR), la PCR-ELISA ou la séparation immunomagnétique PCR (IMS-PCR).

Dans le cas de l'immunocapture-PCR, l'agent pathogène cible est piégé par des anticorps dirigés contre ses antigènes de surface, avant de réaliser l'étape d'amplification PCR. Dans le cas de la PCR-ELISA, les amplicons sont marqués durant l'amplification (à la digoxynine par exemple), puis immobilisés dans des plaques type ELISA en se fixant sur des sondes spécifiques complémentaires. Un dosage ELISA est réalisé à l'aide de sérums dirigés contre la digoxynine, ce qui permet de quantifier l'ADN amplifié.

Concernant l'IMS-PCR, des particules magnétiques ou des billes sont recouvertes d'anticorps dirigés contre les antigènes de surface du micro-organisme cible. Les complexes antigènes-anticorps fixés sur les particules sont récupérés à l'aide d'un aimant. Après une étape de lavage et d'enrichissement, les billes sont ensuite mises en culture sur des milieux semi sélectifs ou utilisées pour faire une PCR (Alvarez, 2004; De Leon *et al.*, 2006). L'IC-PCR a été utilisée avec succès pour la détection de *Pectobacterium atrosepticum* dans des extraits d'épluchures de pomme de terre avec une sensibilité de 100 bact/ml contre 10⁵ bact/ml en PCR conventionnelle (Van der Wolf *et al.*, 1996). La PCR-ELISA permet un gain de temps dans la mesure où il n'y a pas l'étape de révélation sur gel des produits PCR. Elle a été utilisée pour la détection de *E. amylovora* (Merighi *et al.*, 2000). L'IMS-PCR a une sensibilité 100 fois supérieure à celle de la PCR conventionnelle (Munkvold, 2009). Cette technique a

été utilisée pour la détection de *E. carotovora* (Van der Wolf *et al.*, 1996). Par ailleurs, les faux positifs résultant de la détection de l'ADN des cellules mortes, sont parmi les obstacles majeurs des méthodes PCR. La Bio-PCR, une technique qui nécessite une étape préliminaire d'enrichissement de l'isolat en un milieu semi sélectif, permet de réduire les faux positifs. C'est une technique très sensible qui ne détecte que des bactéries viables (Schaad & Frederick, 2002; Schaad *et al.*, 2003). Cette technique a été utilisée pour la détection de *X. oryzae* pv *oryzae* sur des plants de riz avec une sensibilité de 55fg par tube de réaction soit l'équivalent de 70 ufc/ml (Alvarez, 2004; Sakthivel *et al.*, 2001).

b. Méthodes basées sur l'hybridation moléculaire

L'hybridation est basée sur le principe de la formation d'ADN double brin (duplex) entre une molécule d'ADN cible du pathogène et un brin d'acide nucléique complémentaire, appelé sonde, qui est marquée (radioactif ou froid), et dont on va révéler le signal.

Dot Blot et Southern Blot

Dans le cas du Dot Blot, l'ADN à hybrider est déposé sur une membrane de nylon. Des colonies bactériennes peuvent aussi être directement déposées sur la membrane. L'ADN est ensuite dénaturé, fixé puis hybridé à l'aide d'une sonde marquée. En ce qui concerne le Southern Blot, l'ADN bactérien est dans un premier temps digéré par une enzyme de restriction puis les fragments sont séparés suivant leur taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'ADN digéré est dénaturé puis transféré sur membrane de nylon ou nitrocellulose, fixé, puis hybridé à l'aide d'une sonde marquée. Compte tenu des conditions contraignantes d'utilisation des isotopes radioactifs, le marquage froid est maintenant privilégié par rapport à un marquage radioactif. Il existe des systèmes de marquage vendus dans le commerce dont la sensibilité est grande, pratiquement équivalente à celle obtenue avec un marquage radioactif. C'est le cas par exemple du marquage à la peroxidase ou encore à la digoxigenine. L'hybridation est une méthode sensible et spécifique. Cette spécificité peut d'ailleurs être modulée en jouant sur la stringence des conditions d'hybridation. Dans les années 90, de nombreux outils de diagnostic ont été développés sur la base d'une hybridation spécifique. C'est le cas par exemple pour la détection de *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung, 1992), *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Dreier *et al.*, 1995) ou encore de *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Verdier & Mosquera, 1999).

L'hybridation a été progressivement supplée par les méthodes basées sur la PCR, mais elle trouve aujourd'hui un regain d'intérêt avec le développement des microarrays ou puces à ADN, qui sont basées en partie sur cette technique.

Les DNA Arrays

Le principe du DNA Arrays repose sur la technique du dot blot inverse, pour laquelle on a immobilisation sur une membrane ou une lame, d'oligonucléotides ou d'amplicons PCR, correspondant à de nombreuses séquences d'intérêt (ORF, exons ou régions intergéniques), extraction de l'ADN total de l'échantillon (sol, plante), amplification et marquage de séquences spécifiques de ou des microorganismes concernés à partir de ces échantillons puis hybridation de ces amplicons sur lame ou membrane. Après lavage pour éliminer les accrochages aspécifiques, on a détection et analyse du signal émis par l'ADN cible lié spécifiquement à une sonde.

Dans le cas des macroarrays, l'hybridation se fait sur une membrane de nylon, et les ADN cibles fixés sont entre 200 à 5000. Le marquage est le même que celui utilisé en hybridation classique (radioactivité ou marquage froid). Un macroarray a été mis au point pour la détection des bactéries pathogènes de la pomme de terre (Fessehaie *et al.*, 2003).

Dans le cas des microarrays ou puces à ADN (Schena *et al.*, 1995), l'hybridation se fait sur des lames de verre de quelques cm² avec une densité de 5000 cibles/cm². Le marquage est généralement fluorescent, avec possibilité d'utiliser ensemble deux fluorophores (souvent Cy3 et Cy5) ce qui autorise l'hybridation sur un seul et même support d'ADN différemment marqués par ces deux fluorophores.

Cette technique évolue très vite et tend vers la miniaturisation. Actuellement, les Oligochips (= GeneChips = biopuces, type Affymetrix par exemple) sont réalisés sur un support de verre très petit (1 cm²) sur lequel sont synthétisés in situ des oligonucléotides à raison de 65000 oligonucléotides différents par cm² (il existe des versions expérimentales ayant jusqu'à 1 millions de dépôts par cm²).

En diagnostic, les puces à ADN sont utilisées pour la révélation des produits de la PCR en remplacement de la migration sur gel et valident ainsi la spécificité de l'amplification par sa complémentarité avec la sonde. Comparées à d'autres méthodes d'identification comme la PCR en temps réel, les puces à ADN ne sont compétitives que pour l'analyse d'un échantillon

complexe où plusieurs bactéries cibles doivent être analysées (Glaser, 2005). Cette dernière décennie, des microarrays ont été développés dans le domaine médical, pour la détection de virus pathogènes ainsi que de bactéries pathogènes. On commence à trouver des exemples dans le domaine de la phytopathologie, avec un microarray développé pour la détection du *Plum Pox virus* (Pasquini *et al.*, 2008) ainsi qu'un microarray développé pour la détection des principales bactéries pathogènes de la pomme de terre (Aittamaa *et al.*, 2008). Actuellement, dans l'Union Européenne, il y a une volonté d'acquérir et d'appliquer cette technique pour la détection des organismes de quarantaine (Lopez *et al.*, 2009).

6.4. Les méthodes de diagnostic des *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne des Solanées

Deux espèces du complexe *Xanthomonas* spp. des Solanées notamment *X. euvesicatoria* et *X. vesicatoria* sont inscrites sur la liste A2 des organismes de quarantaine de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne de Protection des Plantes, et à ce titre, les lots de semences destinés aux échanges commerciaux doivent être certifiés indemnes de la maladie. Une méthode de tests sur semences de tomate a été publiée par l'OEPP (OEPP/EPPO, 1992) (Figure 1.14). La méthode de diagnostic utilisée en routine pour le premier criblage de cette bactérie dans les semences est l'immunofluorescence sur extraits de semences. Elle est suivie ensuite de l'isolement de la bactérie en milieu semi sélectif (TweenB) et de sa caractérisation par immunofluorescence ou ELISA, et si nécessaire, la mise en oeuvre de tests de confirmation de pouvoir pathogène et de tests biochimiques.

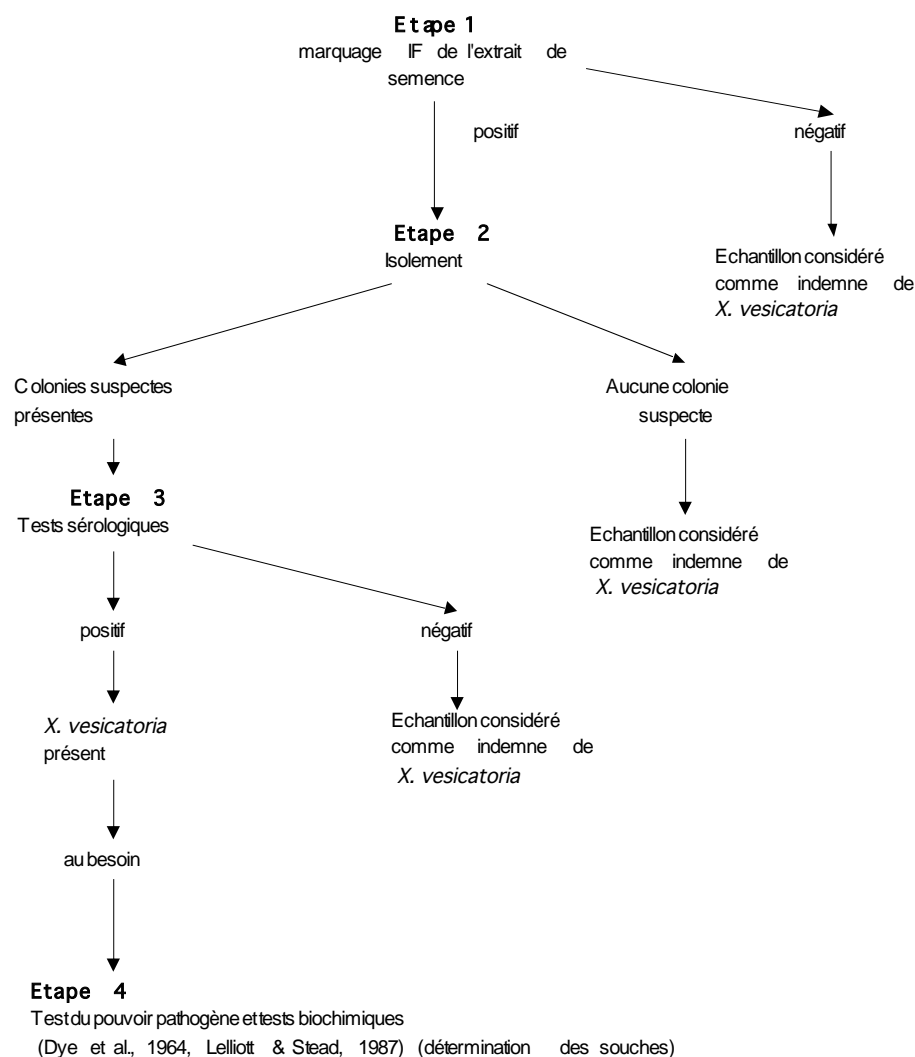


Figure 1.14 : schéma OEPP d'utilisation des tests pour le diagnostic de *X. vesicatoria* dans les semences de tomate

Les extraits obtenus à partir des semences sont d'abord analysés par IF (étape 1), l'isolement n'est réalisé qu'après un résultat positif de l'IF (étape 2). Il n'est nécessaire de poursuivre le test au-delà de l'isolement que si les colonies formées sur le milieu sont conformes au type *X. vesicatoria*. L'étape 3 confirmera que les colonies correspondent bien à *X. vesicatoria*. Mais comme cette bactérie possède plusieurs souches présentant des variations du pouvoir pathogène, en fonction des zones géographiques, et que ces souches ne peuvent pas être différenciées par des méthodes sérologiques, il sera nécessaire de passer à l'étape 4 si de plus amples informations sont demandées.

Des tests sérologiques à l'aide d'anticorps monoclonaux et polyclonaux ont été utilisés dans différentes études pour identifier les espèces de la gale bactérienne (Benedict *et al.*, 1990; Bouzar *et al.*, 1994b; Charudattan *et al.*, 1973; Jones *et al.*, 1993; Schaad, 1976; Stall *et al.*, 1994). Les résultats sont souvent peu probants en terme de spécificité. Notamment, des réactions croisées ont été mises en évidence entre des anticorps polyclonaux développés contre *X. campestris* pv. *vesicatoria* et d'autres pathovars de *X. campestris* (Bouzar *et al.*, 1994b). D'autre part, aucun anticorps polyclonal ou monoclonal dirigé contre *X. campestris*

pv. *vesicatoria* ne s'est montré réagir avec toutes les souches de ce taxon (Benedict *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1993; Stall *et al.*, 1994). En plus de problèmes de spécificité, les méthodes sérologiques utilisées ne sont en général pas suffisamment sensibles pour détecter la bactérie à des concentrations basses, et les délais d'obtention du diagnostic final, du fait de la phase de culture de la bactérie, sont longs. Des méthodes de diagnostic moléculaire, plus sensibles et rapides comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) et l'hybridation ADN-ADN ont également été développées pour ce pathogène.

En 1997, la technique d'hybridation (dot blot et southern blot) a été mise en oeuvre pour la détection des groupes A et B (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* et *X. vesicatoria*) (Kuflu & Cuppels, 1997). Cependant, seuls 89% des souches testées appartenant à ces deux groupes ont répondu positivement et des problèmes de réactions croisées avec des souches non cibles ont été mis en évidence.

Plusieurs outils PCR ont été développés (Cuppels *et al.*, 2006; Koenraadt *et al.*, 2009; Kuflu & Cuppels, 1997; Leite *et al.*, 1995; Obradovic *et al.*, 2004b; Van Doorn *et al.*, 2001). Néanmoins, nous verrons en détail dans le chapitre 4 qu'aucune de ces PCRs n'est capable de détecter l'ensemble des souches de *Xanthomonas spp.* associés à cette maladie.

Problématique-Présentation du sujet

La gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* spp. (piment, poivron) est un problème majeur dans les pays tempérés chauds et tropicaux avec une assez forte incidence économique. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, plusieurs espèces de *Xanthomonas* sont responsables de cette maladie. Un Programme Régional de Protection des Végétaux (PRPV) a été initié en 2003 (<http://www.prpv.org>) dans la région Océan Indien, visant à établir un inventaire des organismes nuisibles présents sur les principales cultures dans cette zone. En particulier, plusieurs missions réalisées aux Seychelles et aux Comores ont montré que la gale bactérienne était la principale maladie bactérienne rencontrée sur tomate, piment et poivron. Cependant, malgré la récurrence des foyers de gale bactérienne dans la région Océan Indien, il n'existait que très peu de données sur les espèces rencontrées dans les pays de la zone au début de cette thèse. Seule, l'espèce *X. vesicatoria* a été décrite dans cette région (Jones *et al.*, 1998).

Le chapitre II est consacré à l'exploration de la diversité des *Xanthomonas* spp. associés à la gale bactérienne de la tomate et des *Capsicum* spp. dans la zone Océan Indien (Réunion, Maurice, Seychelles, Comores, Madagascar). Pour cela, nous avons opté pour la caractérisation des souches par AFLP et MLSA. En complément de ces deux méthodes, une caractérisation du pouvoir pathogène des différentes espèces sur une gamme d'hôtes ciblée a été effectuée.

Des études ultérieures à la reclassification de 1995 (Vauterin *et al.*, 1995) ont décrit plusieurs nouvelles espèces de *Xanthomonas* (Jones *et al.*, 2004; Schaad *et al.*, 2005; Trébaol *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2010). Deux études portant sur des espèces associées à la gale bactérienne (Jones *et al.*, 2004) ou à des espèces proches (Schaad *et al.*, 2005) ont omis d'inclure certaines espèces valides. Par ailleurs, des études récentes visant à analyser la diversité et la structure de l'ensemble des espèces du genre *Xanthomonas* sur la base de données de séquences de gènes de ménage (et donc basées sur un nombre restreint de souches de *Xanthomonas* pathogènes de Solanées), suggèrent une synonymie entre certaines des espèces nouvellement décrites (Parkinson *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008).

Il s'avère donc que la taxonomie actuelle des *Xanthomonas* associés aux Solanées est ambiguë. Ainsi, l'objectif du chapitre III a été d'effectuer une caractérisation génétique et pathologique des différentes espèces de *Xanthomonas* spp. associées aux Solanées à graines, analyser les relations phylogénétiques avec les autres *Xanthomonas* et évaluer la pertinence des espèces proposées. Nous avons utilisé la même approche que dans le chapitre II (AFLP, MLSA). Ces deux méthodes ont l'aptitude de générer un grand nombre de données par rapport à la méthode de référence (hybridations ADN:ADN), ce qui a permis d'analyser une collection de souches représentative de la diversité existante à l'échelle mondiale.

La grande diversité des souches associées à la gale bactérienne pose un défi en terme de diagnostic. L'inscription des espèces *X. euvesicatoria* et *X. vesicatoria* sur la liste A2 des organismes de quarantaine de l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP) rend nécessaire la disponibilité de méthodes d'identification fiable et rapide de ces souches au niveau de l'espèce. Nous avons évalué les caractéristiques de méthodes pertinentes publiées avant le début de la thèse (Cuppels *et al.*, 2006; Koenraad *et al.*, 2009), et dans les cas où les marqueurs existants possédaient des caractéristiques inadéquates, nous avons évalué sur la base des données générées dans les chapitres II et III, le potentiel de marqueurs AFLP pour le diagnostic.

Chapitre II :

Diversité génétique et pathologique des
souches de *Xanthomonas* responsables de la
gale bactérienne des tomates et piments dans
le sud-ouest de l'Océan Indien

Chapitre II : Diversité génétique et pathologique des souches de *Xanthomonas* responsables de la gale bactérienne des tomates et piments dans le sud-ouest de l'Océan Indien

Le chapitre III a fait l'objet d'un article intitulé « **Genetic and pathological Diversity Among *Xanthomonas* Strains Responsible for Bacterial Spot on Tomato and Pepper in the Southwest Indian Ocean Region** » qui a été publié en août 2010 dans la revue Plant Disease (inséré en fin de chapitre).

1. Problématique

Les Solanées maraîchères comme la tomate et le piment sont des constituants majeurs de l'alimentation traditionnelle dans les pays de la zone Océan Indien. La gale bactérienne de la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), et des *Capsicum* spp. (piment, poivron) est un problème majeur dans les pays tempérés chauds et tropicaux sur la totalité des continents. Cinq espèces de *Xanthomonas* sont associées à cette maladie : *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* et *X. c. pv. raphani*. Au début de la thèse, très peu de données étaient disponibles sur cette maladie et les espèces en cause dans la région Océan Indien. La seule référence trouvée dans la littérature concernait l'espèce *vesicatoria* présente dans la zone (Bouzar *et al.*, 1994b). A la Réunion, plusieurs foyers de gale bactérienne avaient déjà été mis en évidence dans les années 1990, mais aucune caractérisation de l'espèce en cause n'avait été alors réalisée. En 2003, dans le cadre de l'inventaire des organismes nuisibles réalisé sur les principales cultures aux Seychelles et aux Comores (www.prpv.org), et qui s'est étendu par la suite aux autres pays de la zone, cette maladie bactérienne s'est avérée particulièrement abondante sur tomate, piment et poivron. Ainsi, malgré l'évidence de la prévalence de la maladie dans cette région, les informations relatives aux espèces rencontrées étaient quasiment inexistantes, ceci excluant toute stratégie de lutte et d'épidémiologie-surveillance.

L'objectif de cette étude était d'explorer la diversité spécifique et intraspécifique des *Xanthomonas* spp. associés aux Solanées à graines dans la région Océan Indien en utilisant des outils moléculaires à haut débit notamment l'AFLP et la MLSA.

2. Méthodologie

Une collection de 133 souches dont 72 isolées de tomate, piment et poivron dans la région Océan Indien a été utilisée dans cette étude.

Nous avons procédé au génotypage de l'ensemble de souches par une analyse AFLP utilisant quatre couples d'amorces (Sac+C/Msp+A, C, T ou G). Les données AFLP ont permis de comparer les souches de *Xanthomonas* spp. isolées de la région Océan Indien avec les cinq souches types des espèces génomiques de *Xanthomonas* associés aux Solanées à graines, *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* et *X. gardneri* et *X. campestris* pv. *raphani*, et d'estimer la parenté génétique entre ces différentes souches. Le calcul des EGD (« Evolutionary Genome Divergence »), exprimés en nombre de substitutions nucléotidiques par site a été utilisé pour comparer les différentes souches de *Xanthomonas* spp. isolées dans la région Océan Indien.

La technique MLSA ou « Multilocus Sequence Analysis » a permis de comparer la séquence de 4 gènes de ménage (*atpD*, *dnaK*, *efp* et *gyrB*) des différentes souches de *Xanthomonas* spp. afin de comprendre les relations génétiques entre elles et avec les cinq souches types des *Xanthomonas* associées aux Solanées à graines.

En dernier lieu, des tests de pouvoir pathogène ont été effectués sur trois variétés sensibles de tomate cv. Marmande, piment cv. aiguille et poivron cv. Yolo Wonder. La progression temporelle de l'apparition de symptômes a été suivie et synthétisée sous la forme de surfaces sous la courbe de la maladie (SSCM) et le type d'interaction (compatible vs. incompatible) a été estimé par des calculs de densités de populations de *Xanthomonas* dans les symptômes exprimés trois semaines après inoculation.

3. Résultats et discussion

Les valeurs d'EGD dérivées de l'analyse AFLP ont montré de très faibles distances génétiques entre les souches de la région et la souche-type ou les souches de référence des

différentes espèces associées à la maladie, rendant aisée l'identification au niveau de l'espèce. Nos travaux apportent une confirmation supplémentaire de l'intérêt de cette technique pour la caractérisation moléculaire de *Xanthomonas* au niveau de l'espèce et/ou du pathovar, qui a déjà été validée par de nombreux travaux (Ah-You *et al.*, 2009; Boudon *et al.*, 2005; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 1996; Rademaker *et al.*, 2000; Restrepo *et al.*, 1999; Roumagnac *et al.*, 2004). Les données générées par MLSA ont de façon générale confirmé la classification obtenue par AFLP. Elles ont également permis de mettre en évidence un événement de recombinaison parmi les souches de *X. euvesicatoria* isolées dans la région. La recombinaison peut limiter la congruence des données dérivées de chacun des gènes étudiés. L'importance de la recombinaison chez les gènes étudiés dans ce travail a fait l'objet d'une analyse plus approfondie dans le chapitre III.

Sur la base des données AFLP et MLSA, toutes les souches isolées dans la région Océan Indien sont réparties dans quatre espèces associées à la gale bactérienne : *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* et *X. gardneri*. L'espèce *X. euvesicatoria* est l'espèce prévalente dans la région Océan Indien (65%). Aucune souche de la région Océan Indien de notre collection n'est proche génétiquement de l'espèce *X. campestris* pv. *raphani*.

Ces résultats nous permettent de proposer un premier inventaire des *Xanthomonas* spp. associés aux Solanées à graines dans la région Océan Indien. La présence avérée de *X. gardneri* se limiterait ainsi à la Réunion, celle de *X. perforans* à Mayotte, aux Seychelles et à Maurice, *X. euvesicatoria* aux Comores, à la Réunion, aux Seychelles et à Maurice, et enfin *X. vesicatoria* à Madagascar et à la Réunion. La plus grande diversité est observée à la Réunion avec trois espèces présentes : *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria* et *X. gardneri*. Ce résultat pourrait faire de la Réunion un site intéressant pour évaluer les échanges génétiques entre espèces et les interactions épidémiologiques en cas de co-infections. Nos résultats complètent les résultats précédents qui présentaient *X. vesicatoria* comme la seule espèce présente dans la région Océan Indien (Jones *et al.*, 1998). Cependant, un des facteurs limitants de ce travail a été notre dépendance vis-à-vis de nos partenaires du développement agricole dans la région pour l'obtention des échantillons biologiques. Une amélioration ultérieure de cet inventaire par l'analyse d'un plus grand nombre d'isolats est souhaitable.

Les souches de la région Océan Indien des espèces décrites ci-dessus ont montré des symptômes typiques de la gale bactérienne sur au moins un hôte. Sur la base des données de

pouvoir pathogène, nous avons montré que la gamme d'hôte des souches de la région Océan Indien identifiées dans quatre espèces de *Xanthomonas* associés aux Solanées, est en accord avec les données de la littérature (Bouzar *et al.*, 1994b; Quezado-Duval *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 2009). Les souches appartenant aux espèces *X. perforans* et *X. vesicatoria* ont provoqué une réaction de type compatible sur tomate cv. Marmande avec des niveaux de population dans les lésions compris entre 3×10^6 et 5×10^7 cfu/lésion. Cependant, inoculées sur piment cv. aiguille et poivron cv. Yolo Wonder, ces souches n'ont montré aucune réaction visible. Les souches appartenant à l'espèce *X. gardneri* ont montré des symptômes typiques de la gale bactérienne des Solanées sur les trois hôtes étudiés. Les niveaux de populations présents dans les lésions ($> 10^7$ cfu/lésion sur les trois hôtes) montrent qu'il s'agit bien d'une réaction de type compatible.

Toutes les souches de la région Océan Indien appartenant à l'espèce *X. euvesicatoria* se sont montrées pathogènes sur tomate cv. Marmande et poivron cv. Yolo Wonder. Les niveaux de population sur poivron sont supérieurs à 10^7 cfu/ lésion. Cependant, sur tomate, les niveaux de population varient suivant les souches entre 1×10^6 et 1×10^8 cfu/lésion. La pathogénie des souches de l'espèce *X. euvesicatoria* s'est montrée variable sur piment cv. aiguille. Huit des souches de *X. euvesicatoria* isolées sur tomate aux Comores et à la Réunion, n'ont montré aucune réaction visible sur piment cv. aiguille. Ce phénotype semble corrélé à une aptitude significativement supérieure de ces mêmes souches à se multiplier dans les symptômes produits sur tomate cv. marmande. Les autres souches de *X. euvesicatoria* ont produit des interactions de type compatible avec ce cultivar de piment (niveaux de population variant de 6×10^6 et 4×10^8 cfu/lésion).

Genetic and Pathological Diversity Among *Xanthomonas* Strains Responsible for Bacterial Spot on Tomato and Pepper in the Southwest Indian Ocean Region

A. A. Hamza, I. Robène-Soustrade, E. Jouen, L. Gagnevin, and P. Lefeuvre, Research Plant Pathologists, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France; F. Chiroleu, Statistician, CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, France; and O. Pruvost, Research Plant Pathologist, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France

ABSTRACT

Hamza, A. A., Robène-Soustrade, I., Jouen, E., Gagnevin, L., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., and Pruvost, O. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Dis.* 94:993-999.

Bacterial spot of tomato and pepper, a major problem in tropical climates, can be caused by several *Xanthomonas* genospecies. We examined the genetic and pathological diversity of a collection of 72 strains from the southwest Indian Ocean region as part of a regional research and development program to update inventories of agricultural pests and pathogens. *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, and *X. vesicatoria* were identified in our strain collection. The identification of strains at the species level was consistently achieved by amplified fragment length polymorphism (AFLP) and multilocus sequence analysis (MLSA). Overall, *X. euvesicatoria* was the species recovered prevalently. MLSA data based on four housekeeping genes identified two to three sequence types per genospecies. It suggested that sequence variations primarily consisted of synonymous mutations, although a recombination event spanning several hundred nucleotides was detected for some strains of *X. euvesicatoria* on the *atpD* gene coding for the F1-F0-ATPase β subunit. The pathogenicity of strains was consistent with data found in the literature. Some pathological variations were primarily observed among strains identified as *X. euvesicatoria*. This study provides the first ever comprehensive description of the status of *Xanthomonas* species that cause bacterial spot of tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region.

Bacterial spot is an important disease of tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum* spp.) in both tropical and more temperate regions (18). The disease is caused by phenotypically and genetically heterogeneous strains of the genus *Xanthomonas*. The latest classification (19) suggested that four genospecies (*Xantho-*

monas euvesicatoria, *X. gardneri*, *X. perforans*, and *X. vesicatoria*) can cause bacterial spot of tomato and pepper (BSTP). These genospecies differ in host range, leading to the description of four races, T1 to T4, on tomato accessions (18) and at least nine races on pepper (21). The relationship between species assignment and host range or races for these strains is not straightforward. Some strains are pathogenic to tomato or pepper or both (18). Other genera in the family *Solanaceae* have been listed as host species. However, this was primarily based on reactions following inoculations, some of which may have been hypersensitive as opposed to compatible reactions (21). Finally, *X. campestris* pv. *raphani* strains primarily pathogenic to cruciferous plant species are also pathogenic to tomato and pepper after inoculation (11,49,50). Moreover, strains causing outbreaks of leaf spot and wilt disease of tomato in Canada (Ontario) and Russia (North Caucasus) were found to be genetically related to *X. campestris* pv. *raphani*, making tomato a natural host species for this pathogen (22,38).

Xanthomonads causing BSTP are listed on the A2 list of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), which means that these pathogens are not widely distributed in the EPPO region and are recommended for regulation

as quarantine pests ([http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02\(18\)_A1A2_2009.pdf](http://archives.eppo.org/EPPOStandards/PM1_GENERAL/pm1-02(18)_A1A2_2009.pdf)). An accurate identification of strains causing BSTP is of particular importance for surveillance and pest management. Over the last decades, the tools most often used for the molecular typing of xanthomonads causing BSTP included repetitive element (rep)-polymerase chain reaction (PCR), pulsed-field gel electrophoresis, and PCR-restriction fragment length polymorphism of the *hrpB* region (8,23,30,46). We and others have shown the suitability of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and multilocus sequence analysis (MLSA) for identification of xanthomonads at the species and pathovar levels (2,10,40,51). The advantages and limitations of both techniques have been reviewed previously (2). One of these studies (10) hypothesized that the atypical placement of *X. euvesicatoria* within the *X. axonopodis* cluster 9.2 sensu Rademaker et al. likely is a consequence of recombination.

A regional program for plant protection (<http://www.prpv.org/>) focusing on southwest Indian Ocean (SWIO) territories was initiated in 2003. It was implemented by the Indian Ocean Commission with the following member countries: Comoros, Madagascar, Mauritius, Réunion, and the Seychelles. One of the objectives of the program was to elaborate an updated database of pests and pathogens present in these countries. In this article, we identify the strains causing BSTP at the species level in the SWIO region by using AFLP and MLSA based on four housekeeping genes and assess the infraspecific genetic diversity of each group.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, media, and DNA extraction. In all, 133 strains, including 72 strains from the SWIO region, were studied. Information on bacterial strains is provided in Supplementary Table 1. Strains from the SWIO region were isolated from diseased plant material on yeast-peptone-glucose agar (YPGA; yeast extract, 7 g liter⁻¹; peptone, 7 g liter⁻¹; glucose, 7 g liter⁻¹; agar, 18 g liter⁻¹; and propiconazole, 20 μ g ml⁻¹; pH 7.2) or on KC semiselective medium (37). Plates were incubated for up to five days at 28°C. *Xanthomonas*-like colonies were subcultured on YPGA

Corresponding author: O. Pruvost
E-mail: olivier.pruvost@cirad.fr

*The e-Xtra logo stands for "electronic extra" and indicates that three supplemental tables and three supplemental figures not included in the print edition are available online.

GenBank accession numbers for partial sequences used in the MLSA study are available from GenBank (*atpD*: EU015202, EU015204, EU015209 to EU015212, EU015214, EU015215, GU322721 to GU322805, HM048893 to HM048896; *dnaK*: EU015294, EU015296, EU015301 to EU015304, EU015306, EU015307, GU322636 to GU322720, HM048889 to HM048893; *efp*: FJ376351 to FJ376353, FJ376355, FJ376356, FJ376365, FJ376375, FJ376376, GU322551 to GU322635, HM048885 to HM048888; *gyrB*: EU015386, EU015388, EU015393, EU015394, EU015395, EU015396, EU015398, EU015399, GU322466 to GU322550, HM048881 to HM048884).

Accepted for publication 8 April 2010.

doi:10.1094/PDIS-94-8-0993

© 2010 The American Phytopathological Society

medium. All cultures were stored as lyophilic or at -80°C in Microbank tubes (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). For DNA extractions, 24-h-old subcultures on YPGA were used to inoculate yeast-peptone broth. Tubes were incubated for 16 to 18 h at 28°C under agitation. DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Courtabouef, France) following the manufacturer's instructions and DNA concentrations were estimated spectrophotometrically (Nanodrop Technologies, Labtech, Palaiseau, France).

AFLP analysis. All strains were subjected to AFLP analysis. Two independent DNA extractions were used for all strains. The type strains of *X. euvesicatoria* (NCPBP 2968), *X. gardneri* (NCPBP 881), *X. perforans* (NCPBP 4321), and *X. vesicatoria* (LMG 911) were used as controls in each AFLP experiment. PCR reactions were performed in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Courtabouef, France). Adaptors and PCR primers were synthesized by Applied Biosystems (Supplementary Table 2).

AFLP analysis was performed as described previously (2). The selective amplifications were performed using unlabeled *MspI* + 1 (A, C, T, or G) primers and 5'-labeled – *SacI* + C primers (fluorochromes used: 6-FAM, VIC, NED, and PET, respectively). Electrophoresis was performed in an ABI PRISM-3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using performance-optimized polymer POP-7 at 15,000 V for about 20 min at 60°C , with an initial injection of 69 s. The AFLP fingerprints were analyzed visually using Genemapper software 4.0 (Applied Biosystems). The threshold for assigning a peak was set to 500 relative fluorescence units. The presence and absence of fragments were scored as a binary matrix.

Evolutionary genome divergences (EGDs) were calculated from Dice similarity indices and corrected to account for unobserved substitutions by using the standard Jukes-Cantor model, which assumes equal rates of substitution between all pairs of bases (28,35). EGD values were used as distances to construct a weighted neighbor-joining (NJ) tree (12,45) using the R statistical package (version 2.9.1; R Development Core team) and the APE package version 2.3 (32). The robustness of the trees was assessed by bootstrap (1,000 resamplings).

MLSA. Four gene portions—*atpD*, *dnaK*, *efp*, and *gyrB* (2,6,33,51)—were amplified using the BD advantage 2 polymerase mix kit (Clontech, Ozyme, Montigny-Le Bretonneux, France), as recommended by the manufacturer, using primers shown in Supplementary Table 3. Amplifications were performed in a PE9600 thermocycler (Applied Biosystems) as follows: an initial denaturation at 95°C for 3 min was followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 95°C , annealing

for 1 min at 66°C , and extension for 1 min at 68°C and a final extension step at 68°C for 7 min. For a small number of strain–gene combinations, the annealing temperature was modified (63 to 68°C) for optimal PCR quality or yield. The amplicons were sequenced by MacroGen or Cogenics (*efp*) (single-pass double-stranded analysis), using primers shown in Supplementary Table 3.

DNA sequences for each gene were aligned using the Clustal W based subalignment tool (48) available in the MEGA 4.1 program (47). The Nei and Gojobori method (29) was used for evaluating the synonymous/nonsynonymous substitution (Ka/Ks) ratios using the MEGA 4.1 program. The detection of potential recombinant sequences, identification of likely parental sequences, and localization of possible recombination breakpoints were carried out on concatenated sequence alignments by using a set of seven nonparametric detection methods: RDP (24), Geneconv (31), MaxChi (27), Chimera (36), bootscan (25), SiScan (13), and 3Seq (5), all of which were run in the RDP3 software (26). Analyses were performed with default settings for the different detection methods and a Bonferroni corrected *P* value cutoff of 0.05. Recombination events were accepted when detected with three or more detection methods. The breakpoint positions and recombinant sequences inferred for every detected potential recombination event were visually checked and adjusted when necessary by using the extensive phylogenetic and recombination signal analysis features available in RDP3. Maximum likelihood (ML) trees were built for the recombinant and nonrecombinant regions using the PHYML (14) subroutine available in RDP3, using the Kimura 2-parameter model.

Pathogenicity tests. Solanaceous species used for pathogenicity tests included tomato (*S. lycopersicum*) cv. Marmande and pepper (*Capsicum annuum*) cvs. Yolo Wonder and Aiguille. Five to seven week-old seedlings were used for inoculation. Strains tested for pathogenicity included the type strain of the four valid *Xanthomonas* species causing bacterial spot disease and all strains originating from the SWIO region ($n = 72$). Bacterial suspensions containing approximately 1×10^5 CFU ml^{-1} were obtained by 10-fold dilutions in 0.01 M sterile Sigma 7-9 buffer (pH 7.2; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) of spectrophotometrically adjusted suspensions (0.05 optical density at 600 nm: approximately 1×10^8 CFU ml^{-1}) prepared from 18-h-old cultures on YPGA. Sterile Sigma 7-9 buffer was used as the inoculum for negative controls. Suspensions were infiltrated (0.3 to 0.4 cm^2) into the abaxial side of the mesophyll of young leaves using a needleless syringe. For each strain, six inoculation points were performed on one leaf from three different plants. Plants

were placed in growth chambers at $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (day) and $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (night) and $80 \pm 5\%$ relative humidity for 25 days with a photoperiod of 12 h. Leaves were checked daily for lesion development. Bacterial population sizes in symptomatic plants were assessed for the type strain of each species causing BSTP and at least one representative of each AFLP haplotype among strains originating from the SWIO region. Population sizes were determined at the end of experiments (25 days after inoculation [dai]) from single lesions (at least 10 replicates were analyzed) using a Spiral System device (Interscience) on KC semiselective medium (37), except for strain NCPBP 881, for which slower growth was recorded on KC medium and the NCTM1 semiselective medium was used (44). Bacterial population sizes were based on enumeration of *Xanthomonas*-like colonies. All experiments were replicated at least once. Bacterial population sizes were log-transformed to stabilize sample variances prior to statistical analysis using the R statistical package. The Bartlett test used for assessing variance homogeneity indicated that this criterion was not met for some data sets. Therefore, nonparametric tests (Kruskal-Wallis and Wilcoxon-Mann-Whitney tests) were performed. For the latter test, adjusted *P* values for multiple comparisons were calculated using the Benjamini and Holberg method (4).

The three reference strains of *X. campestris* pv. *raphani* were checked for pathogenicity to radish (*Raphanus sativus*). Spray inoculations to radish cv. rond Gaudry 2 and koto leaves were performed using bacterial suspensions containing approximately 1×10^8 CFU ml^{-1} and prepared as described above. Environmental parameters and visual assessment of disease development were as described above.

RESULTS

AFLP analysis. EGD values calculated for each pair of the type strain of species causing BSTP or the pathotype strain of *X. campestris* pv. *raphani* were >0.100 nucleotide substitutions per site (nsps), except for *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, which differed only by 0.045 nsps. All strains originating from the SWIO region displayed low EGD values (i.e., <0.030 nsps) with one of the type strain of the genospecies associated with BSTP and, thus, were easily identified at the species level. Computation of EGDs between SWIO-originating strains and the type strain of all valid *Xanthomonas* spp. confirmed that no misidentification had occurred (*data not shown*). In the SWIO region, we identified strains that were genetically related to *X. euvesicatoria* ($n = 47$), *X. gardneri* ($n = 9$), *X. perforans* ($n = 11$), and *X. vesicatoria* ($n = 5$) (Fig. 1). However, none were related to *X. campestris* pv. *raphani*. The geographical distribu-

tion of species is shown in Figure 2. Overall, *X. euvesicatoria* was the prevalent species (65%) among the SWIO strains studied. The largest diversity was recorded in Réunion, with the identification of three species: *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, and *X. vesicatoria*.

NJ trees were built for assessing the within-species genetic diversity and relationships among strains. Branches connecting groups of *X. gardneri* strains were characterized by low (<80%) bootstrap values. A single strain (ICMP 7383) originating from New Zealand was markedly different from other *X. gardneri* strains. *X. gardneri* strains that were identified from samples originating from Réunion Island clustered as a nonrobust group (Supplementary Figure 1).

Given the relatively low EGD value between *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, the genetic diversity of both species was assessed concomitantly and is shown in Supplementary Figure 2. Strains identified as *X. perforans* in the Seychelles and Mayotte islands clustered with the *X. perforans* type strain and formed a robust group (with a bootstrap of 100%). Within this cluster, two robust groups of strains originating from Mayotte and the Seychelles were identified with strong bootstrap values. All strains identified as *X. euvesicatoria* grouped as a robust cluster (with a bootstrap of 100%). Most strains within the *X. euvesicatoria* species were separated by relatively short branches supported by low (<80%) bootstrap values. However, a group containing six strains that originated from India ($n = 4$) and Grenada ($n = 2$) clustered as a robust group with a bootstrap value of 100%. Strain ICMP 8037 from Brazil was characterized by a long branch due to the presence of one private marker and the absence of seven markers present in all other *X. euvesicatoria* strains (Supplementary Figure 2). Among strains originating from the SWIO region, strains originating from Mauritius formed a robust group (with a bootstrap of 90%) that also contained strain CFBP 5618 from the United States. Some of the strains originating from the Comoros (LA88-1 to -6) formed another robust group with a maximal bootstrap value. Other strains identified as *X. euvesicatoria* and originating from the Comoros and Réunion scattered within the NJ tree.

In contrast, a strong structure with tree branches supported by bootstrap values of 100% was shown for *X. vesicatoria*, leading to the identification of two groups of strains (Supplementary Figure 3). Most strains clustered in the first group, including the type strain. Strains originating from Madagascar and Réunion clustered in a second group, which also contained two strains originating from Europe (France and Italy). Some strains from Madagascar and Réunion had an identical AFLP fingerprint.

MLSA. Analyzed sequence lengths ranged from 387 bp (*efp*) to 771 bp (*gyrB*), leading to a total of 2,667 bp for the four regions sequenced. The average Ka/Ks for all gene portions was <<1, confirming that synonymous mutations markedly exceeded nonsynonymous mutations.

Interestingly, six recombination detection algorithms significantly detected a recombination event in the *atpD* gene portion, with beginning and ending breakpoints estimated at position 1 and 309, respectively. The tree derived from the alignment of the *atpD* region showed an evidence of recombination for most (45/51) strains of *X. euvesicatoria* (sequence type [ST] E1 and ST E3), which had a marked sequence divergence with *X. perforans* (all STs) and *X. euvesicatoria* ST E2. Because interspecies recombination can distort phylogenetic relatedness among similar species, two ML trees describing the genetic relatedness among strains in the recombinant region (Fig. 3A) and in the concatenated dataset but the recombinant region (Fig. 3B), respectively, were computed. *X. euvesicatoria* and *X. perforans* were closely related based on the tree derived from the alignment of the concatenated dataset but the recombinant region (Fig. 3B), consistent with AFLP data.

All species associated with BSTP could be distinguished by MLSA, consistent with AFLP data. Based on concatenated data, three STs were identified among

strains of *X. euvesicatoria*. Most strains (37/51) were ST E1, including the type strain. ST E2 comprised six strains originating from India and Grenada, consistent with AFLP data. This group was markedly different from other *X. euvesicatoria* STs based on data derived from *atpD*, because it was the only one that did not show the recombinant region. On other gene portions, it also differed from other STs, based on one to three single-nucleotide polymorphisms (SNPs). ST E3 was only identified among some of the strains originating from Mauritius and Réunion. They differed from ST E1 by only one SNP on the *atpD* gene portion (outside the recombinant region). Similarly, three STs were identified among strains of *X. perforans*. ST P1 comprised the type strain of *X. perforans* and most strains originating from the Seychelles. A single strain from this country (LB102-2; ST P2) differed from ST P1 strains based on one SNP on the *gyrB* gene portion. ST P3 comprised strains originating from Mayotte and differed from STs P1 and P2 based on one SNP on the *efp* gene portion. All strains of *X. gardneri* originating from the SWIO region had sequences that were totally identical to that of the type strain of this species (ST G1). ST G2 only comprised strain ICMP 7383 and its sequence differed by 12 SNPs scattered on the *gyrB* locus (that were not identified as a putative recombination event by RDP3). Most strains of *X. vesicatoria* had sequences that were totally identical to that of the type strain, whatever the gene portion (ST V1).

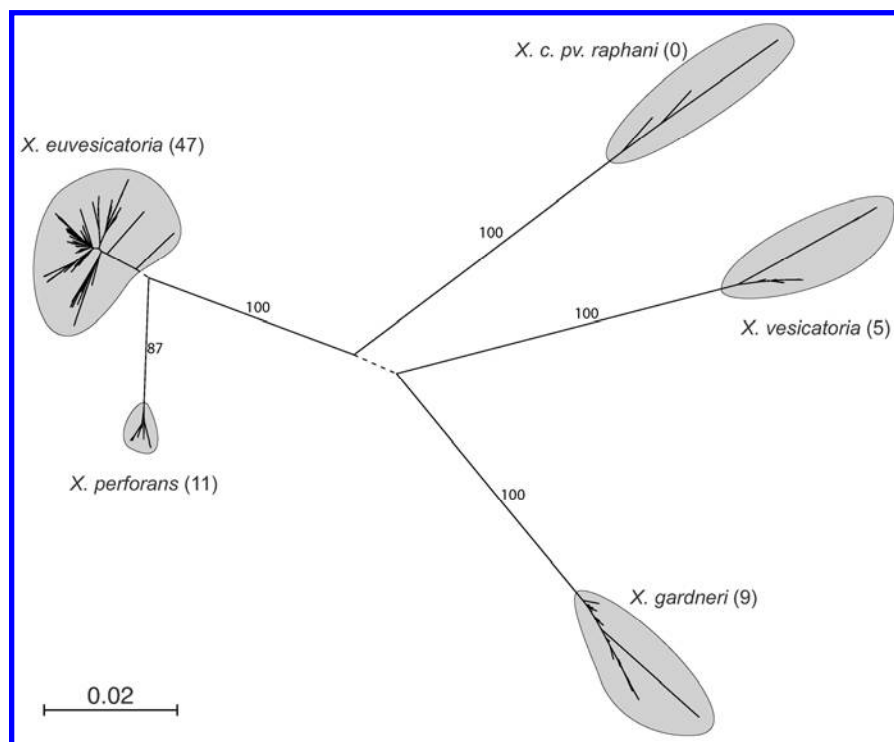


Fig. 1. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (28) showing the relationships among strains responsible for bacterial spot of tomato and pepper based on 485 amplified fragment length polymorphism markers. Branches with bootstrap values <80% are represented by dotted lines. Bootstrap values $\geq 80\%$ are shown along the corresponding branches. For each species, numbers in parentheses indicate the numbers of strains isolated in the southwest Indian Ocean region.

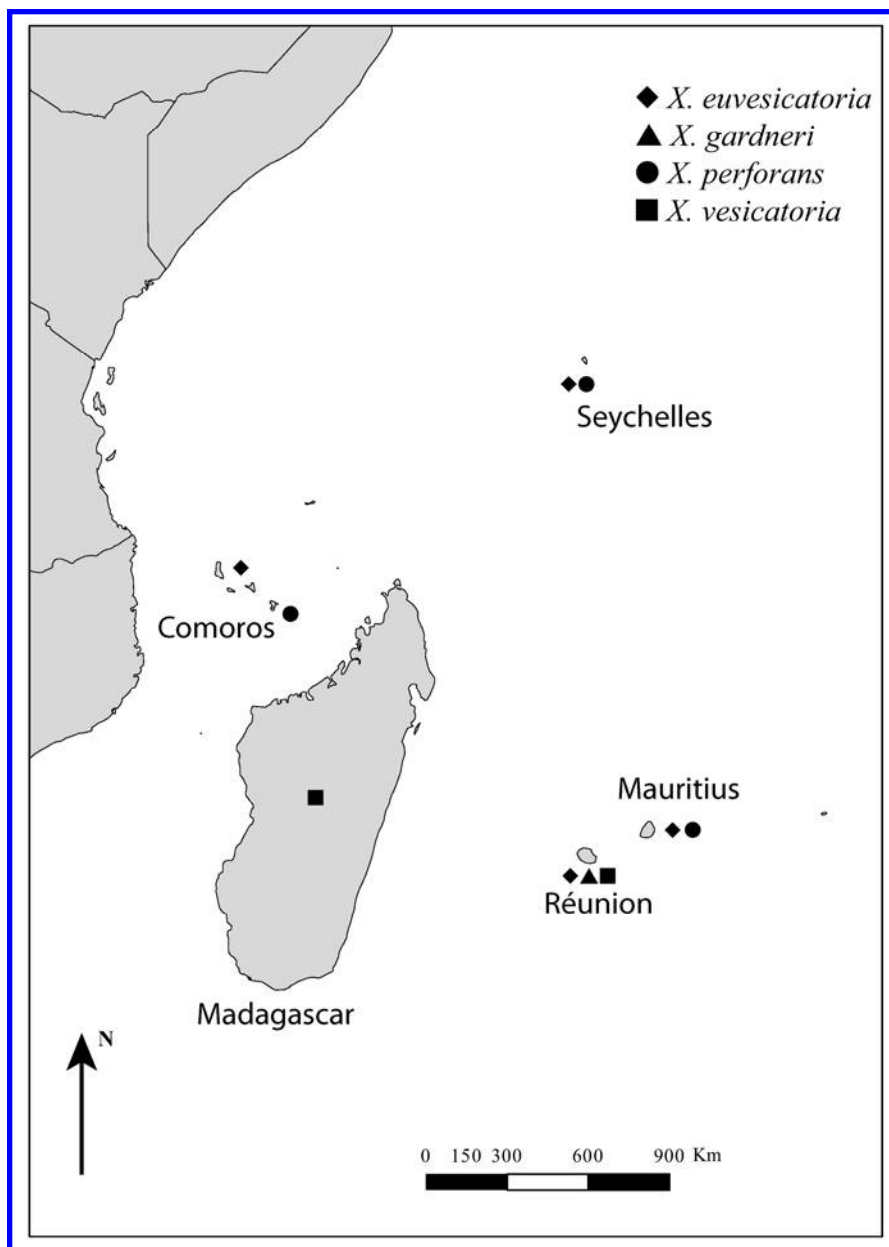


Fig. 2. Distribution map of the *Xanthomonas* genospecies responsible for bacterial spot of tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region.

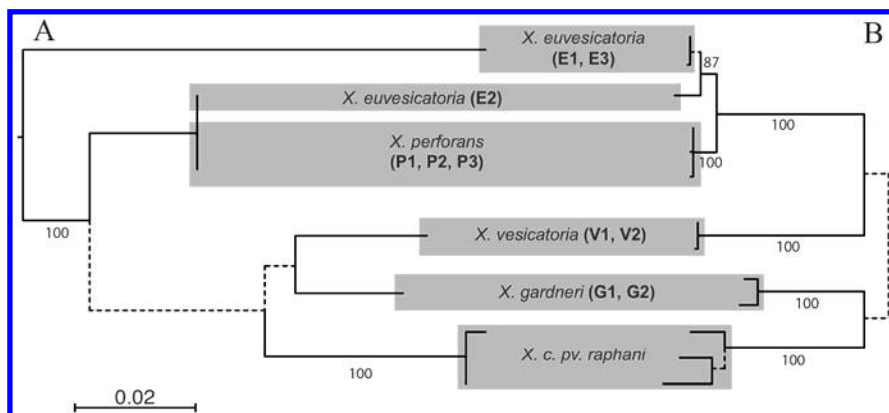


Fig. 3. Maximum likelihood tree based on concatenated *atpD*, *dnaK*, *ef*, and *gyrB* partial sequences, showing the relationships between *Xanthomonas* genospecies associated with bacterial spot of tomato and pepper. **A**, Tree based on the 309-bp *atpD* sequence identified by the RDP package as a recombinant region in some *Xanthomonas euvesicatoria* strains (sequence type [ST] E1 and ST E3). **B**, Tree based on the concatenated sequence deleted of the recombinant region. Branches with bootstrap values lower than 80% are represented by dotted lines.

Strains originating from Madagascar and Réunion had sequences that were totally identical to that of two strains (CFBP 1545 and NCPPB 3311) originating from Europe, whatever the gene portion (ST V2). This ST differed from ST V1 on the basis of two SNPs on the *gyrB* gene portion.

The three reference strains of *X. campestris* pv. *raphani* were identified as three different STs. With a single exception (CFBP 5827 versus CFBP 5828 for the *ef* gene portion), each strain was distinguishable whatever the assayed gene based on 1 to 13 SNPs. No strain originating from the SWIO region was genetically related to this pathovar.

Pathogenicity tests. The three reference strains of *X. campestris* pv. *raphani* produced typical leaf lesions whatever the radish cultivar assayed. All other strains were pathogenic to at least one solanaceous species (Table 1). Lesions first appeared as small water-soaked spots that enlarged slightly and became necrotic over time, whatever the inoculated plant species. All assayed strains identified as *X. perforans* and *X. vesicatoria* were only pathogenic to tomato. Lesions on inoculated leaves were first observed 4 to 6 and 3 to 5 dai for strains of *X. perforans* and *X. vesicatoria*, respectively. Mean population sizes recovered from leaf lesions ranged from 6×10^6 to 5×10^7 and from 3×10^6 to 2×10^7 CFU/lesion, respectively. No visible symptom or hypersensitive response-like reaction was observed on either of the pepper cultivars for strains of *X. perforans* and *X. vesicatoria*.

All strains identified as *X. gardneri* produced lesions on tomato cv. Marmande and pepper cvs. Yolo Wonder and Aiguille. Leaf lesions started to develop 3 to 5 dai, whatever the cultivar. Mean population sizes recovered from leaf lesions ranged from 1×10^7 to 4×10^7 , 3×10^7 to 2×10^8 , and 2×10^7 to 7×10^7 CFU/lesion for tomato cv. Marmande and pepper cvs. Yolo Wonder and Aiguille, respectively.

The pathogenicity profiles observed for the *X. euvesicatoria* species were more variable among strains. All strains identified as *X. euvesicatoria* that originated from the SWIO region ($n = 72$) produced lesions on tomato cv. Marmande and pepper cv. Yolo Wonder, species for which lesions were first observed 3 to 5 dai. In contrast, differential pathogenicity reactions were recorded when pepper cv. Aiguille was inoculated with strains of *X. euvesicatoria*. Nine strains produced no visible reactions in response to inoculations. This was recorded for several strains originating from the Comoros and Réunion and also for the type strain of *X. euvesicatoria*.

On pepper cv. Aiguille, strains that produced lesions had mean population sizes per lesion ranging from 6×10^6 to 4×10^8 CFU/lesion, suggestive of compatible interactions. Mean population sizes per le-

sion on pepper cv. Yolo Wonder ranged from 2×10^7 to 5×10^8 CFU/lesion. On tomato, population sizes were more heterogeneous and differed significantly ($P < 0.0001$) among strains. The largest population sizes (with means approximating 1×10^8 CFU/lesion and significantly differing from those of other strains) were reproducibly recovered from lesions caused by some strains isolated from tomato and originating from the Comoros and Réunion (Table 2). Such strains were the ones to be avirulent on pepper cv. Aiguille. In contrast, lower population sizes (with means ranging from 8×10^4 to 2×10^7 CFU/lesion) were recovered from lesions caused by other strains. Strains that displayed the lowest population sizes when inoculated on tomato were isolated from diseased pepper samples in Mauritius, Réunion, and the Seychelles (Table 2). No clear-cut differences in the morphology of leaf lesions or the speed of lesion development after inoculation were recorded among strains of either group.

DISCUSSION

In the present study, *Xanthomonas* strains responsible for outbreaks of BSTP

in the SWIO region were assigned to species using AFLP. AFLP has already been extensively used for investigating the species classification in the genus *Xanthomonas* (2,10,17,40,43), the intrapathovar assessment of genetic diversity (1,6,9,41), and addressing epidemiology-related questions (16,34). The examination of genetic distances of strains from the SWIO region to type or pathotype strains of *X. campestris* pv. *raphani*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, and *X. vesicatoria* meant that identification at the species level was unambiguous. Genetic distances calculated among type strains were mostly consistent with their separation into distinct species. The one exception was between *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, consistent with other recent data suggesting the synonymy between these species (33,51). More data are needed to examine the question further.

MLSA data suggested that synonymous SNPs were the primary source of sequence variation on the four targeted housekeeping genes. However, a recombination event was detected on the *atpD* gene portion for most (45/51) strains of *X. euvesicatoria*. We hypothesize that recombination oc-

curred on this species from an unknown, distantly related *Xanthomonas* sp. The nucleotide sequence of this region did not match that of other species causing BSTP, suggesting that these were probably not involved in the recombination event (or the recombinant region is a mosaic structure resulting from numerous independent recombination events, which is improbable). A blast search using the recombinant region as the query did not allow identification of the species or pathovar, which may have been involved in the recombination event. The phylogenetic tree obtained when the recombinant region was deleted from the concatenated alignment indicated a very close relatedness between *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, consistent with AFLP data. Our results illustrate the limitations of single-gene-based phylogenies, which are more prone than MLSA to erroneous estimations of relatedness among similar species as a result of interspecies recombination (15). MLSA accurately identified strains associated with BSTP at the species level. Our results suggest that at least two genes (*dnaK* and *gyrB* are recommended) should be targeted for routine identification of BSTP-causing xanthomonads, although the classification of new strains into the ST system described herein would require the use of the complete scheme.

Two to three sequence types were identified per species and they corresponded to strains that formed robust clusters based on AFLP data. One major advantage of MLSA or multilocus sequence typing over genotyping techniques, such as AFLP or rep-PCR, is that it allows more robust interlaboratory comparisons, leading to the possible development of Internet databases

Table 1. Pathogenicity profiles based on leaf infiltrations of 72 xanthomonad strains associated with bacterial spot of tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region

<i>Xanthomonas</i> spp.	Inoculated host species and cultivar		
	Tomato cv. Marmande	Pepper cv. Yolo Wonder	Pepper cv. Aiguille
<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (n = 38)	+	+	+
<i>X. euvesicatoria</i> (n = 9)	+	+	–
<i>X. perforans</i> (n = 11)	+	–	–
<i>X. gardneri</i> (n = 9)	+	+	+
<i>X. vesicatoria</i> (n = 5)	+	–	–

Table 2. Examples of pathogenicity and population sizes recorded from leaf lesions 25 days after the inoculation of two host species with *Xanthomonas euvesicatoria*

Strain	Host of isolation	Country	Tomato cv. Marmande		Pepper cv. Aiguille			
			Pathogenicity ^x	Population size ^y	Pathogenicity ^x	Population size ^y		
NCPPB 2968 ^z	<i>Capsicum frutescens</i>	United States	+	(4–6)	6.94 (0.52) d	–	NA	
LA84-1	<i>C. annuum</i>	Comoros	+	(4–7)	7.11 (0.35) d	+	(9–11)	7.47 (0.78) bcdef
LA88-2	<i>C. annuum</i>	Comoros	+	(3)	6.98 (0.27) d	+	(9–13)	6.84 (0.46) f
LA88-4	<i>C. annuum</i>	Comoros	+	(3–4)	7.18 (0.34) cd	+	(7–9)	7.33 (0.56) e
LE82-4	<i>C. annuum</i>	Mauritius	+	(4)	5.26 (0.58) g	+	(5–6)	8.29 (0.10) ab
LE83-1	<i>C. annuum</i>	Mauritius	+	(4)	6.07 (0.59) e	+	(5)	8.12 (0.25) c
LE84	<i>C. annuum</i>	Mauritius	+	(3–5)	5.40 (0.41) g	+	(6–7)	7.64 (0.46) cd
LA127-1	<i>C. annuum</i>	Réunion	+	(4–6)	5.77 (0.45) f	+	(6)	8.51 (0.46) a
LA127-2	<i>C. annuum</i>	Réunion	+	(4)	5.56 (0.55) fg	+	(4–5)	7.51 (0.44) de
LD128-1	<i>C. annuum</i>	Seychelles	+	(4–5)	6.30 (0.62) e	+	(5–7)	7.44 (0.40) de
LD128-2	<i>C. annuum</i>	Seychelles	+	(4–5)	5.68 (0.48) f	+	(7–9)	6.82 (0.56) f
LB226-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comoros	+	(3–4)	6.98 (0.41) d	+	(7–12)	7.71 (0.35) cde
LB102-1	<i>S. lycopersicum</i>	Seychelles	+	(4–5)	7.31 (0.43) c	+	(11–13)	7.85 (0.24) c
LB215-2	<i>S. lycopersicum</i>	Comoros	+	(3–4)	8.08 (0.48) a	–		NA
JW6	<i>S. lycopersicum</i>	Réunion	+	(3–4)	8.12 (0.44) a	–		NA
JW7	<i>S. lycopersicum</i>	Réunion	+	(3–4)	7.97 (0.44) a	–		NA
LB230-1	<i>S. lycopersicum</i>	Réunion	+	(3–5)	7.77 (0.38) b	–		NA
LB230-2	<i>S. lycopersicum</i>	Réunion	+	(3–5)	7.95 (0.41) a	–		NA

^x Number of days after inoculation (dai) for record of initial lesion; + = development of lesions, – = no development of lesions, and NA = not available.

^y Population sizes were determined on KC semiselective medium (37), and 8 to 12 lesions per strain–host combination were used for population size assessment. Each value represents log-transformed CFU lesion^{–1}. Values in parentheses are standard deviations. Strain comparisons were based on Wilcoxon-Mann-Whitney tests. Population size values with the same letters did not differ significantly ($P = 0.05$).

^z Type strain.

(15). Such tools could markedly improve international surveillance of clones associated with major plant bacterial diseases.

This study provides the first comprehensive description of the status of *Xanthomonas* spp. causing BSTP in the SWIO region. Although the analysis of more strains will be needed in future for a more thorough description of the precise sanitary status of all the islands in the region, a wide genetic diversity of strains associated with BSTP was recorded. Only *X. campestris* pv. *raphani* was not detected. Our study further amends the data produced by Jones et al. (21) a decade ago, which suggested that only *X. vesicatoria* was present in the SWIO region.

Strains originating from the SWIO region and causing BSTP had pathological characteristics, which agreed with data available in the literature. *X. perforans* and *X. vesicatoria* strains were isolated solely from tomato and were pathogenic to this species but not to pepper, which is consistent with previous data (7,42). Strains identified as *X. gardneri* were isolated from diseased samples of tomato and pepper and were pathogenic to both species, consistent with earlier data from Brazil (39). For these three species, no marked infraspecific pathogenic variations were observed among strains from the SWIO region. In contrast, three different pathogenicity profiles were identified among strains of *X. euvesicatoria*. A common feature was that all *X. euvesicatoria* strains shared pathogenicity to pepper cv. Yolo Wonder, with no marked quantitative variations among strains (*data not shown*). The first group included strains isolated from tomato in Réunion over at least 6 years, and from the Comoros. Although these strains did not differ in terms of leaf lesion morphology or length of the pathogenic latency period when inoculated to tomato cv. Marmande, they survived in lesions at population sizes significantly larger than all other assayed strains. Moreover, they were avirulent on pepper cv. Aiguille, although this local cultivar is not known for having pepper resistance genes in its genome. The second group included strains isolated from tomato in the Comoros and the Seychelles. These strains were pathogenic to tomato cv. Marmande and pepper cv. Aiguille. The third group included strains isolated from pepper in the Comoros, Mauritius, Réunion, and the Seychelles. These strains were pathogenic to tomato cv. Marmande and pepper cv. Aiguille. Most strains from this group multiplied to low population sizes ($\leq 2 \times 10^6$ CFU/lesion) when inoculated to tomato cv. Marmande. This group of strains was genetically heterogeneous, as determined by AFLP. All strains identified as ST E3 by MLSA were weakly aggressive on tomato cv. Marmande, although a few strains identified as ST E1 were, too. To our knowledge, no tomato or pepper culti-

vars bearing resistance genes to the causal agents of BSTP are grown commercially in the SWIO region.

The species and haplotype composition in the SWIO region populations probably reflects the history of pathogen introductions through one or several pathways, such as contaminated seed (3,20). For *X. vesicatoria*, it was found that, based on AFLP, strains isolated in Madagascar and Réunion were most closely related to strains originating from France and Italy. These strains formed a robust cluster easily distinguishable from another group that included the *X. vesicatoria* type strain. MLSA data consistently identified the strains originating from the SWIO region as the same ST as strains from France and Italy. Tomato and pepper seed are an important pathway for the introduction of BSTP-causing xanthomonads in the SWIO region. In Réunion, the application of a CE quality standard for tomato and pepper seedlings has contributed to a lesser incidence of seedborne bacterial pathogens in the field. Similar certification schemes are implemented or currently being developed in other countries in the SWIO region.

ACKNOWLEDGMENTS

The Programme Régional de Protection des Végétaux (PRPV) was funded by the 8th European Development Fund (contract PRPV-COI/FED/05-007) under the authority of the Indian Ocean Commission. The European Regional Development Fund of the European Union, Conseil Régional de La Réunion, and CIRAD also provided financial support. We thank P. Prior, C. Vernière, M. Le Saux, V. Grimault, and M. Roux-Cuvellier for helpful discussion or manuscript review before submission; S. Benimadhu, D. Cuppels, B. Hostachy, P. Prior, and G. Wuster for providing us with diseased plant material or bacterial strains; and C. Boyer, W. Grondin, A. Laurent, V. Ledoux, and K. Vital for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Ah-You, N., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Jouen, E., Neto, J. R., and Pruvost, O. 2007. Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by amplified fragment length polymorphism. *Phytopathology* 97:1568-1577.
- Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A. D., Brisse, S., Nesme, X., Chiroleu, F., Bui Thi Ngoc, L., Jouen, E., Lefeuvre, P., Vernière, C., and Pruvost, O. 2009. Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to Anacardiaceae and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:306-318.
- Bashan, Y., and Okon, Y. 1986. Internal and external infections of fruits and seeds of peppers by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can. J. Bot.* 64:2865-2871.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 57:289-300.
- Boni, M. F., Posada, D., and Feldman, M. W. 2007. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176:1035-1047.
- Boudon, S., Manceau, C., and Notteghem, J. L. 2005. Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western

Europe. *Phytopathology* 95:1081-1088.

- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A., and Alvarez, A. M. 1994. Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* 84:663-671.
- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Louws, F. J., Schneider, M., Rademaker, J. L. W., De Bruijn, F. J., and Jackson, L. E. 1999. Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89:328-335.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jarne, P., Brisse, S., Guérin, F., Boutry, S., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2009. From local surveys to global surveillance: three high throughput genotyping methods for the epidemiological monitoring of *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:1173-1184.
- Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:515-525.
- Fargier, E., and Manceau, C. 2007. Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 56:805-818.
- Gascuel, O. 1997. Concerning the NJ algorithm and its unweighted version UNJ. Pages 149-171 in: *Mathematical Hierarchies and Biology*. B. Mirkin, F. R. McMorris, F. Roberts, and A. Rzhetsky, eds. American Mathematical Society, Providence, RI.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J. S., and Gibbs, A. J. 2000. Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16:573-582.
- Guindon, S., and Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696-704.
- Hanage, W. P., Fraser, C., and Spratt, B. G. 2006. Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Philos. Trans. R. Soc. Ser. B* 361:1917-1927.
- Humeau, L., Roumagnac, P., Picard, Y., Robène-Soustrade, I., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2006. Quantitative and molecular epidemiology of bacterial blight of onion in seed production fields. *Phytopathology* 96:1345-1354.
- Janssen, P., Coopman, R., Huys, G., Swings, J., Bleeker, M., Vos, P., Zabeau, M., and Kersters, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142:1881-1893.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Minsavage, G. V., Stall, R. E., and Schaad, N. W. 2005. Bacterial spot. Worldwide distribution, importance and review. *Acta Hort.* 695:27-33.
- Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E., and Schaad, N. W. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:755-762.
- Jones, J. B., Pohronezny, K. L., Stall, R. E., and Jones, J. P. 1986. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology* 76:430-434.
- Jones, J. B., Stall, R. E., and Bouzar, H. 1998. Diversity among xanthomonads pathogenic on pepper and tomato. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:41-58.
- Kufu, K. M., and Cuppels, D. A. 1997. Devel-

- opment of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4462-4470.
23. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and Debruijn, F. J. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85:528-536.
24. Martin, D., and Rybicki, E. 2000. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 16:562-563.
25. Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A., and Williamson, C. 2005. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 21:98-102.
26. Martin, D. P., Williamson, C., and Posada, D. 2005. RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21:260-262.
27. Maynard-Smith, J. 1992. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol.* 34:126-129.
28. Mougél, C., Thioulouse, J., Perrière, G., and Nesme, X. 2002. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:573-586.
29. Nei, M., and Gojobori, T. 1986. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3:418-426.
30. Obradovic, A., Mavridis, A., Rudolph, K., Janse, J. D., and Arsenijevic, M. 2004. Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from peppers and tomatoes in Serbia. *Eur. J. Plant Pathol.* 110:285-292.
31. Padidam, M., Sawyer, S., and Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
32. Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20:289-290.
33. Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J., and Stead, D. 2007. Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2881-2887.
34. Picard, Y., Roumagnac, P., Legrand, D., Humeau, L., Robène-Soustrade, I., Chiroleu, F., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2008. Polyphasic characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* associated with outbreaks of bacterial blight on three *Allium* species in the Mascarene archipelago. *Phytopathology* 98:919-925.
35. Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougél, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J., and Nesme, X. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7123-7131.
36. Posada, D., and Crandall, K. A. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13757-13762.
37. Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F., and Gagnevin, L. 2005. New media for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *J. Appl. Microbiol.* 99:803-815.
38. Punina, N. V., Ignatov, A. N., Pekhtereva, E. S., Kornev, K. P., Matveeva, E. V., Polityko, N. I., and Schaad, N. W. 2009. Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in the Russian federation. *Acta Hortic.* 808:287-290.
39. Quezada-Duval, A. M., Leite Jr., R. P., Truffi, D., and Camargo, L. E. A. 2004. Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Dis.* 88:157-161.
40. Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P., and De Bruijn, F. J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:665-677.
41. Restrepo, S., Duque, M., Tohme, J., and Verdier, V. 1999. AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology* 145:107-114.
42. Robbins, M. D., Darrigues, A., Sim, S. C., Mohammed Abu Taher Masud, and Francis, D. M. 2009. Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. *Phytopathology* 99:1037-1044.
43. Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P., and Pruvost, O. 2004. Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:15-24.
44. Roumagnac, P., Gagnevin, L., and Pruvost, O. 2000. Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:867-877.
45. Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
46. Stall, R. E., Beaulieu, C., Egel, D., Hodge, N. C., Leite, R. P., Minsavage, G. V., Bouzar, H., Jones, J. B., Alvarez, A. M., and Benedict, A. A. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:47-53.
47. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
48. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The Clustal x Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
49. Vicente, J. G., Everett, B., and Roberts, S. J. 2006. Identification of isolates that cause a leaf spot disease of brassicas as *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* and pathogenic and genetic comparison with related pathovars. *Phytopathology* 96:735-745.
50. White, H. E. 1930. Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 20:653-662.
51. Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M., and Fargier, E. 2008. A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31:366-377.

Fig. S1. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (28) showing the relationships among strains of *Xanthomonas gardneri* based on 146 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates the type strain. Strain numbers in bold characters are for strains originating from the SWIO region.



Fig. S2. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (28) showing the relationships among strains of *Xanthomonas euvesicatoria* and *X. perforans* based on 262 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates type strains. Strain numbers in bold characters are for strains originating from the SWIO region.

Fig. S2

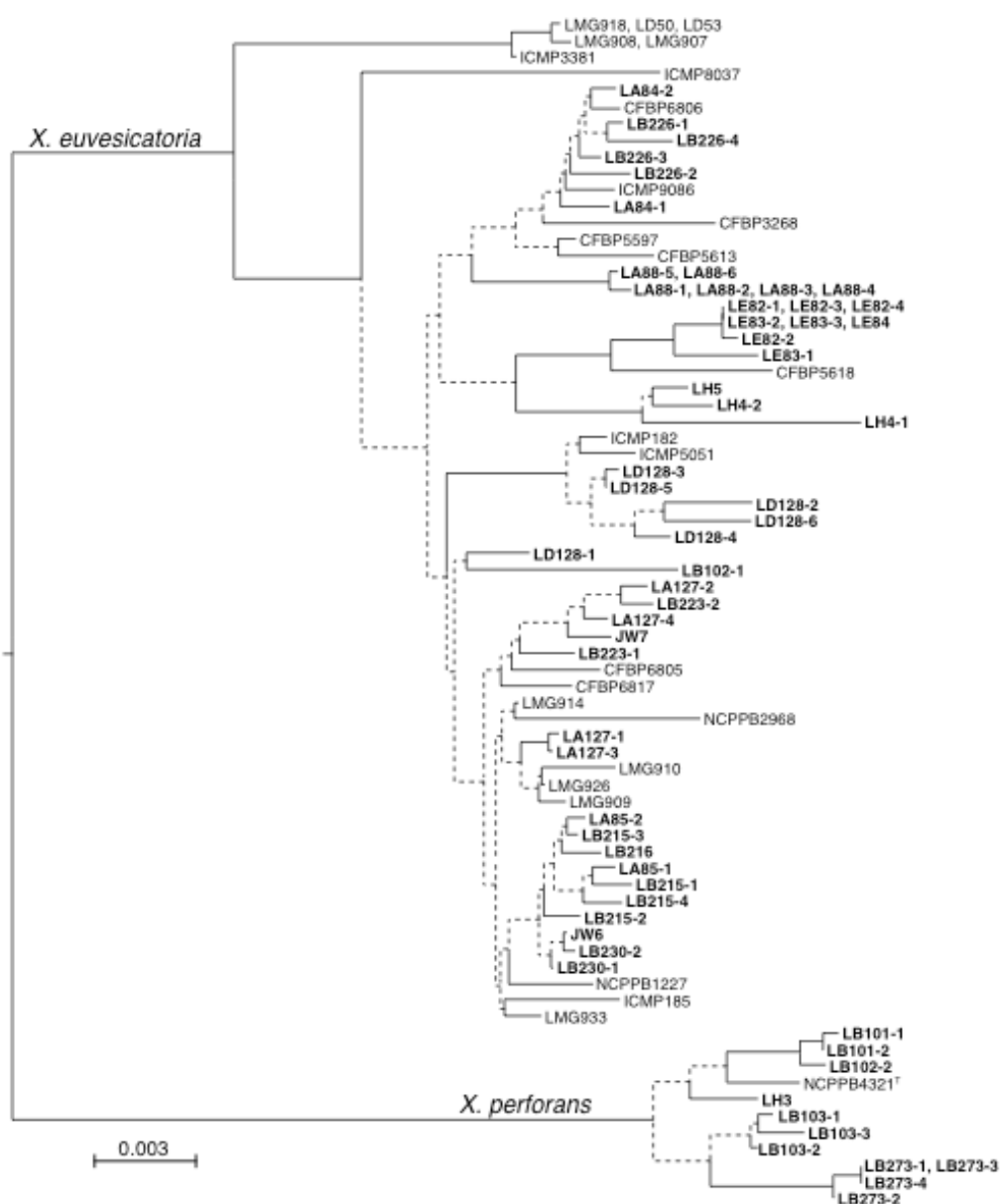
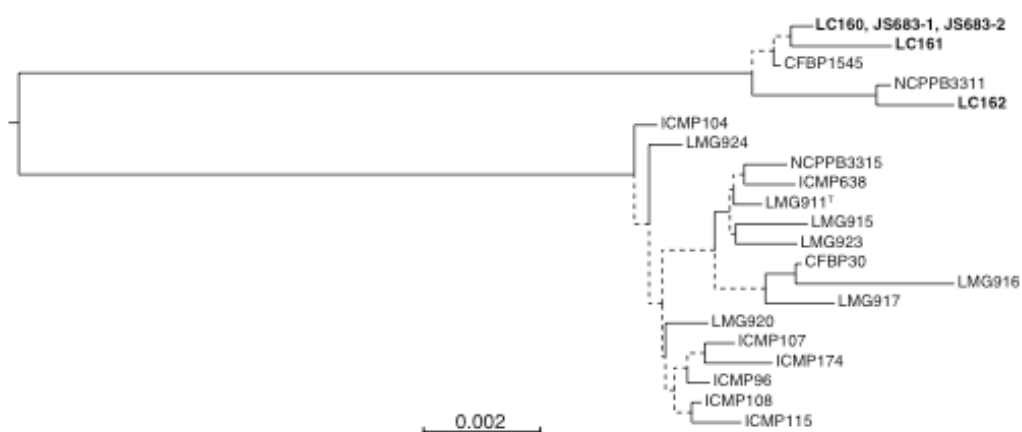


Fig. S3. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (28) showing the relationships among strains of *Xanthomonas vesicatoria* based on 188 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates the type strain. Strain numbers in bold characters are for strains originating from the SWIO region.

Fig. S3



Supplementary Table 1. *Xanthomonas* strains used in this study

Name	Strain number	Host of isolation	Country	Year of isolation	Source	Techniques used	Sequence type	Pathogenicity to pepper cv. Aiguille
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i> ¹	CFBP 5827	<i>Raphanus sativus</i>	USA	1940	CFBP	AFLP/MLSA	R1	NA ²
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	CFBP 5828	<i>Raphanus sativus</i>	USA	NA	CFBP	AFLP/MLSA	R2	NA
<i>X. campestris</i> pv. <i>raphani</i>	CFBP 5829	<i>Raphanus sativus</i>	USA	NA	CFBP	AFLP/MLSA	R3	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 6805	NA	Argentina	1987	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 8037	<i>Capsicum annuum</i>	Brazil	1981	ICMP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 933	<i>Capsicum frutescens</i>	Brazil	1970	LMG	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LA84-1, LA85-1, LA88-1, LA88-2, LA88-3, LA88-4, LA88-5, LA88-6	<i>Capsicum annuum</i>	Comoros	2004	This study	AFLP/MLSA	E1	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LA84-2, LA85-2	<i>Capsicum annuum</i>	Comoros	2004	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LB215-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LB226-1, LB226-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LB215-2, LB215-3, LB215-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP	NA	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LB226-2, LB226-3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LB223-1	<i>Capsicum annuum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LB223-2	<i>Capsicum annuum</i>	Comoros	2005	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 3268	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	NA	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 5597, CFBP 5613	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	1993	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LD50, LD53	<i>Capsicum annuum</i>	Grenada	2007	P. Prior	AFLP/MLSA	E2	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 9086	<i>Capsicum annuum</i>	Hungary	1982	ICMP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 926	<i>Capsicum frutescens</i>	Hungary	1957	LMG	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 3381	<i>Capsicum annuum</i>	India	1971	ICMP	AFLP/MLSA	E2	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 907, LMG 908	NA	India	NA	LMG	AFLP/MLSA	E2	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 918	<i>Capsicum frutescens</i>	India	1957	LMG	AFLP/MLSA	E2	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 909	<i>Capsicum</i> sp.	Ivory coast	1979	LMG	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LE82-1, LE82-3, LE82-4, LE83-1, LE83-3	<i>Capsicum annuum</i>	Mauritius	2008	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LE82-2, LE83-2, LE84	<i>Capsicum annuum</i>	Mauritius	2008	This study	AFLP/MLSA	E3	Yes

<i>X. euvesicatoria</i>	LH4-1, LH4-2, LH5	<i>Capsicum annuum</i>	Mauritius	2010	This study	AFLP/MLSA	E3	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG 910	<i>Solanum lycopersicum</i>	Morocco	1979	LMG	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 5051	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	1976	ICMP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	NCPPB 1227	<i>Solanum lycopersicum</i>	Puerto Rico	NA	NCPPB	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	JW6	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	2000	This study	AFLP/MLSA	E1	No
<i>X. euvesicatoria</i>	JW7	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	2000	This study	AFLP	NA	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LA127-1, LA127-4	<i>Capsicum annuum</i>	Réunion	2004	This study	AFLP/MLSA	E3	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LA127-2, LA127-3	<i>Capsicum annuum</i>	Réunion	2004	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LB216	<i>Capsicum annuum</i>	Réunion	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LB230-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LB230-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	2005	This study	AFLP	NA	No
<i>X. euvesicatoria</i>	LMG914	<i>Solanum lycopersicum</i>	Senegal	1979	LMG	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	LB102-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Seychelles	2005	This study	AFLP/MLSA	E1	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LD128-1, LD128-4, LD128-5, LD128-6	<i>Capsicum annuum</i>	Seychelles	2007	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	LD128-2, LD128-3	<i>Capsicum annuum</i>	Seychelles	2007	This study	AFLP/MLSA	E1	Yes
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 6806	NA	Spain	1986	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 6817	NA	Thailand	1997	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	CFBP 5618	<i>Capsicum annuum</i>	USA	NA	CFBP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i>	ICMP 182, ICMP 185	<i>Capsicum annuum</i>	USA	NA	ICMP	AFLP/MLSA	E1	NA
<i>X. euvesicatoria</i> ³	NCPPB 2968	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	NA	NCPPB	AFLP/MLSA	E1	No
<i>X. gardneri</i>	CFBP 6822	NA	Argentina	1987	CFBP	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	IBSBF 1782	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	1998	IBSBF	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	IBSBF 1783	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	1997	IBSBF	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	LD59	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	2003	D. Cuppels	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	LD67	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	2000	D. Cuppels	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	ICMP 111	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	1957	ICMP	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	ICMP 117, ICMP 119, ICMP 121, ICMP 122	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	1960	ICMP	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	ICMP 7383	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	1980	ICMP	AFLP/MLSA	G2	NA
<i>X. gardneri</i>	JQ711, JQ725	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	1995	This study	AFLP/MLSA	G1	Yes
<i>X. gardneri</i>	JQ724	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	1995	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. gardneri</i>	JS749-1, JS749-2, JS749-3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	1997	This study	AFLP/MLSA	G1	Yes
<i>X. gardneri</i>	JS750-1, JS750-3	<i>Capsicum annuum</i>	Réunion	1997	This study	AFLP/MLSA	G1	Yes

<i>X. gardneri</i>	JS750-2	<i>Capsicum annuum</i>	Réunion	1997	This study	AFLP	NA	Yes
<i>X. gardneri</i>	IBSBF 2373	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	NA	IBSBF	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i>	ICMP 1620	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	1953	ICMP	AFLP/MLSA	G1	NA
<i>X. gardneri</i> ³	NCPPB 881	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	NA	NCPPB	AFLP/MLSA	G1	Yes
<i>X. perforans</i>	LH3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mauritius	2010	This study	AFLP/MLSA	P1	No
<i>X. perforans</i>	LB273-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mayotte	2005	This study	AFLP	NA	No
<i>X. perforans</i>	LB273-2, LB273-3, LB273-4	<i>Solanum lycopersicum</i>	Mayotte	2005	This study	AFLP/MLSA	P3	No
<i>X. perforans</i>	LB101-1, LB101-2, LB103-3	<i>Solanum lycopersicum</i>	Seychelles	2005	This study	AFLP/MLSA	P1	No
<i>X. perforans</i>	LB102-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Seychelles	2005	This study	AFLP/MLSA	P2	No
<i>X. perforans</i>	LB103-1, LB103-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Seychelles	2005	This study	AFLP	NA	No
<i>X. perforans</i> ³	NCPPB 4321	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	NCPPB	AFLP/MLSA	P1	No
<i>X. vesicatoria</i>	CFBP 30	<i>Solanum lycopersicum</i>	France	1953	CFBP	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	CFBP 1545	<i>Solanum lycopersicum</i>	France	1973	CFBP	AFLP/MLSA	V2	NA
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 115, ICMP 174	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	1957	ICMP	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 923	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	1957	LMG	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 924	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	1957	LMG	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	NCPPB 3315	NA	Hungary	NA	NCPPB	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 915	NA	Israel	1947	LMG	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 920	<i>Solanum lycopersicum</i>	Italy	1959	LMG	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	NCPPB 3311	<i>Solanum lycopersicum</i>	Italy	NA	NCPPB	AFLP/MLSA	V2	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LC160	<i>Solanum lycopersicum</i>	Madagascar	2006	This study	AFLP	NA	No
<i>X. vesicatoria</i>	LC161, LC162	<i>Solanum lycopersicum</i>	Madagascar	2006	This study	AFLP/MLSA	V2	No
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 638	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	1963	ICMP	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i> ³	LMG 911	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	1955	LMG	AFLP/MLSA	V1	No
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 917	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	1955	LMG	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	LMG 916	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	1955	LMG	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	JS683-1	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	1997	This study	AFLP	NA	No
<i>X. vesicatoria</i>	JS683-2	<i>Solanum lycopersicum</i>	Réunion	1997	This study	AFLP/MLSA	V2	No
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 104	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	ICMP	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 107	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	1943	ICMP	AFLP/MLSA	V1	NA
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 108	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	1943	ICMP	AFLP	NA	NA
<i>X. vesicatoria</i>	ICMP 96	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	1939	ICMP	AFLP	NA	NA

Some strains included in this study were deposited in the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, INRA Angers, France), the

BCCM/LMG (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, University of Ghent, Belgium), International Collection of Micro-organisms

from Plants (ICMP, Auckland, New Zealand) and the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPPB, CSL, York, United Kingdom).

Other sources were also provided.

¹ Pathotype strain.

² Not available.

³ Type strain.

Supplementary Table 3. Amplification and sequencing primers used in the MLSA scheme

Gene	Amplification primers (5' > 3')		Sequencing primers (5' > 3')	
<i>atpD</i>	GGGCAAGATCGTTCAGAT	9-26 ¹	GGGCAAGATCGTTCAGAT	9-26
	GCTCTTGGTCGAGGTGAT	859-876	GCTCTTGGTCGAGGTGAT	859-876
<i>dnaK</i>	TGGGCAAGATCATTGGTATT	2-21	TGGGCAAGATCATTGGTATT	2-21
	ACCTTCGGCATAACGGGTCTG	1030-1049	GCATCGGCGGTGACGTAC	855-872
<i>efp</i> ²	GTCAAGAACGGCATGAAGA	25-43	GTCAAGAACGGCATGAAGA	25-43
	TCGTCCTGGTTGACGAAC	500-517	TCGTCCTGGTTGACGAAC	500-517
<i>efp</i> ³	TCATCACCGAGACCGAAT	68-85	TCATCACCGAGACCGAAT	68-85
	TCCTGGTTGACGAACAG	496-512	TCCTGGTTGACGAACAG	496-512
<i>gyrB</i>	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	301-320	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	301-320
	GGCCGAGCCACCTGCCGAGT	1307-1326	ATGGCCTTGGCTTCGTTC	1051-1069

Some of the primers used were described previously (1, 10).

¹ Primers complement indicated base numbers. Numbers are derived from the gene sequences of *Xanthomonas citri* pv. *citri* strain 306.

² Primers used for *X. gardneri* and *X. vesicatoria*.

³ Primers used for other *Xanthomonas* species.

Supplementary Table 2. AFLP primers and adaptors used in this study

Ligation adaptors	sequence 5' > 3'
<i>Msp</i> I adaptor A1MSP	GACGATGAGTCCTGAG
A2MSP	CGCTCAGGACTCATC
<i>Sac</i> I adaptor A1SAC	CTCGTAGACTGCGTACAAGCT
A2SAC	TGTACGCAGTCTACG
Preamplification primers	sequence 5' > 3'
<i>Msp</i> I primer	GATGAGTCCTGAGCGG
<i>Sac</i> I primer	TAGACTGCGTACAAGCTC
Selective amplification <i>Msp</i>I primers	sequence 5' > 3'
	GATGAGTCCTGAGCGGA
	GATGAGTCCTGAGCGGC
	GATGAGTCCTGAGCGGT
	GATGAGTCCTGAGCGGG
Labeled selective amplification <i>Sac</i>I primers	sequence 5' > 3'
	6-FAM [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	VIC [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	NED [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	PET [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
AFLP primers and adaptors were described previously (1, 2, 9, 10, 34).	

Chapitre III :

Caractérisation génétique et biologique des
Xanthomonas associés à la tomate et au
Capsicum spp. (piment, poivron) et leur
relation avec les autres espèces de
Xanthomonas

Chapitre III : Caractérisation génétique et biologique des *Xanthomonas* associés à la tomate et au *Capsicum* spp. (piment, poivron) et leur relation avec les autres espèces de *Xanthomonas*

Ces travaux ont donné lieu à une publication initialement soumise le 03/07/2010. La version acceptée avec modifications de cette publication intitulée « **Genetic and pathological characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species** » a été soumise le 27 octobre 2010 à la revue International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (inséré en fin de chapitre).

1. Problématique

Des études récentes visant à analyser les relations phylogénétiques entre les espèces décrites au sein du genre *Xanthomonas* sur la base de données de séquences d'un ou de plusieurs gènes de ménage (Parkinson *et al.*, 2007; Parkinson *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2008), dans lesquelles un nombre faible de souches associées à la gale bactérienne des Solanées à graines ont été incluses, ont motivé notre analyse exhaustive de ce groupe pour clarifier leur classification. Dans ce chapitre, nous proposons l'application de l'approche utilisée dans le chapitre précédent sur une collection importante de souches de *Xanthomonas* pathogènes des Solanées à graines afin d'approfondir les relations phylogénétiques entre les *Xanthomonas* des Solanées entre eux et avec les autres espèces du genre *Xanthomonas*. Une caractérisation pathologique est venue compléter les données moléculaires montrant une proximité génétique entre taxons. Elle a concerné les groupes *X. gardneri*-*X. cynarae*-*X. hortorum* ainsi que *X. alfalfae*/ *X. euvesicatoria* et *X. perforans*, avec des données plus approfondies obtenues pour *X. gardneri*-*X. cynarae* (inoculations croisées). Des analyses de pouvoir pathogène ont permis également de trancher sur le statut de différentes souches de collection.

Enfin, nous avons également analysé la congruence des données obtenues en MLSA et mis en évidence des phénomènes de recombinaison au sein des espèces de *Xanthomonas*, dont un concerne les souches pathogènes des solanées.

2. Méthodologie

Nous avons appliqué le schéma de typage utilisé dans le chapitre II, sur une collection mondiale de souches de *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne de la tomate et des piments (150 souches) et une collection de référence comprenant l'ensemble des souches type des espèces valides au sein du genre *Xanthomonas*.

Nous avons évalué ensuite le pouvoir pathogène sur tomate et piment de 5 souches reçues comme étant des *Xanthomonas* des Solanées mais qui ne groupent avec aucune des 5 espèces de *Xanthomonas* associés aux Solanées en utilisant les mêmes variétés de tomate, piment et poivron que l'étude précédente et la même approche expérimentale. De plus, la pathogénie de *X. alfalfae* sur tomate et piment a été évaluée en utilisant des plants inoculés avec *X. euvesicatoria* et *X. perforans* comme témoins positifs. De la même manière, la pathogénie de *X. cynarae*, *X. gardneri* et *X. hortorum* a été évaluée sur les trois cultivars utilisés tout au long de ce travail et sur artichaut cv. violet de Provence. Enfin, nous avons évalué le pouvoir pathogène de 3 souches isolées de tomate et qui se sont avérées génétiquement proches de *X. campestris* en les inoculant avec 3 souches de *X. campestris* pv. *raphani* sur les variétés de tomates et piments précitées et sur deux variété de radis (Gaudry 2 et Kocto).

3. Résultats et discussion

En utilisant une approche basée sur deux méthodes moléculaires complémentaires permettant de typer un grand nombre de souches bactériennes, nos résultats ont permis de clarifier les données contradictoires issues de la littérature, de classer des souches mal décrites et de suggérer des problèmes ponctuels de souches dans les collections internationales. En analysant des collections de souches assez larges et représentatives de la répartition mondiale de ces bactéries, nos résultats ont confirmé et complété des travaux récents de taxonomie dont l'objectif était une description globale des relations génétiques entre l'ensemble des espèces décrites dans le genre *Xanthomonas* (Parkinson *et al.*, 2007; Parkinson *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2008), avec comme conséquence l'analyse d'un faible nombre de souches associées à la gale bactérienne des Solanées à graines.

Ainsi, nos données AFLP et MLSA ont confirmé que *X. vesicatoria* est éloigné génétiquement de toutes les autres espèces de *Xanthomonas*. Les souches des espèces

X. euvesicatoria et *X. perforans* sont génétiquement proches entre elles et avec la souche type de *X. alfalfae* et nous confirmons la probable synonymie de ces trois espèces. En effet, la comparaison des données AFLP entre ces espèces et les données de Ah-You *et al.* suggèrent que les distances génétiques entre *X. euvesicatoria*, *X. perforans* et *X. alfalfae* correspondent à des valeurs de $\Delta T_m \leq 2^\circ\text{C}$ (Ah-You *et al.*, 2009).

Nous avons également montré une forte similarité génétique des souches de *X. gardneri* et *X. cynarae* avec des distances AFLP correspondant à des $\Delta T_m \leq 1^\circ\text{C}$. Ces deux espèces se révèlent également génétiquement proches de l'espèce *X. hortorum*, bien que les distances dérivées des données AFLP suggèrent un niveau de relation à la limite du seuil de l'espèce bactérienne tel qu'habituellement accepté (Wayne *et al.*, 1987). Les souches de *X. gardneri* et *X. cynarae* ont produit des symptômes morphologiquement similaires sur artichaut, tomate, piment et poivron. Les niveaux de population mesurés dans les lésions ($> 10^6$ cfu par lésion) indiquent que les deux espèces interagissent de façon compatible avec l'artichaut, la tomate et les *Capsicum*. Néanmoins, les souches de *X. gardneri* atteignent généralement des niveaux de population statistiquement supérieurs (0,5 à 1,5 unité logarithmique) sur Solanées par rapport à *X. cynarae*. En revanche, il n'existe pas de différences claires entre les deux groupes de souches en terme de populations *in planta* lorsque les deux groupes de souches ont été inoculés sur artichaut. Cependant, nos résultats ont été obtenus après infiltration de l'inoculum dans les espaces intercellulaires. Des études complémentaires utilisant des méthodes d'inoculation mimant les infections naturelles (pulvérisations) permettraient d'affiner la connaissance de cette interaction entre les souches et les Solanées.

Trois souches isolées de tomate aux USA et en Zambie sont génétiquement proches de l'espèce *X. campestris* et plus précisément des souches du pathovar *raphani*. Les trois souches de *X. campestris* isolées de tomate ont provoqué sur radis inoculés par pulvérisation des symptômes identiques à ceux causés par les trois souches de *X. campestris* pv. *raphani* étudiées et des niveaux de population similaires dans les symptômes produits (Fargier & Manceau, 2007). Ceci confirme une étude canadienne indiquant que la tomate est un hôte naturel de *X. campestris* pv. *raphani* (Kuflu & Cuppels, 1997).

L'analyse préliminaire des séquences nucléotidiques concaténées à l'aide du logiciel Splitstree a montré une structure en réseau plutôt qu'en arbre, ce qui indique l'existence de conflits entre les phylogénies issues des différentes régions et suggère l'existence de

phénomènes de recombinaison chez les loci analysés (Huson, 1998). Sur la base du test de Shimodaira-Hasegawa (S-H test), les topologies des arbres de maximum de vraisemblance issus de chacun des quatre gènes séquencés et celui construit sur la base des séquences concaténées ne sont pas congruentes. L'analyse des séquences concaténées avec le logiciel RDP (Martin *et al.*, 2005) de deux jeux de données : (1) la collection complète couvrant l'ensemble des espèces de *Xanthomonas* et (2) les souches du groupe 16S rDNA *X. campestris* core (Hauben *et al.*, 1997) a permis de détecter sept événements de recombinaison dans trois portions des gènes (*atpD*, *dnaK* et *gyrB*). Un seul événement de recombinaison a été détecté parmi les souches pathogènes des Solanées : *X. euvesicatoria* STE1. Nos résultats suggèrent des transferts horizontaux occasionnels de gènes et des phénomènes de recombinaison au niveau des gènes de ménage dans l'histoire évolutive des *Xanthomonas*.

Genetic and pathological characterization of xanthomonads associated with bacterial spot of tomato and pepper and their relatedness to *Xanthomonas* species.

A. A. Hamza¹, I. Robene-Soustrade¹, E. Jouen¹, P. Lefeuvre¹, F. Chiroleu¹, M. Fisher-Le Saux², L. Gagnevin¹, and O. Pruvost¹.

¹ CIRAD, UMR Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical CIRAD-Université de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 7, chemin de l'Irat, 97410 Saint Pierre, La Réunion, France.

² INRA, UMR A77 Pavé, 42 rue G. Morel, 49071 Beaucouzé, France.

Corresponding author: Olivier Pruvost. Tel : (262) 262 49 92 20, Fax: (262) 262 49 92 93.
E-mail: olivier.pruvost@cirad.fr

Running title: Characterization of xanthomonads from tomato and pepper
Evolution, Phylogeny and Biodiversity

The Genbank accession number for the partial sequences used in the MLSA study are: *atpD*: EU015124 to EU015138, EU015140 to EU015156, EU015158 to EU015163, EU015165 to EU015169, EU015173 to EU015176, EU015178, EU015183 to EU015186, EU015188 to EU015189, EU015196 to EU015200, EU015202, EU015204 to EU015212, EU015214 to EU015215, EU333904 to EU333906, FJ376085 to FJ376086, FJ376089, FJ376114, FJ376118, FJ376130 to FJ376133, GU322721 to GU322736, GU322757 to GU322758, GU322762 to GU322763, GU322765 to GU322781, GU322789 to GU322790, GU322798 to GU322800, GU322804 to GU322805, HM568889 to HM568972; *dnaK*: EU015216 to EU015230, EU015232 to EU015248, EU015250 to EU015255, EU015257 to EU015261, EU015265 to EU015268, EU015270, EU015275 to EU015278, EU015280 to EU015281, EU015288 to EU015292, EU015294, EU015296 to EU015304, EU015306 to EU015307, EU333907 to EU333909, FJ376135 to FJ376136, FJ376139, FJ376164, FJ376168, FJ376180 to FJ376183, GU322636 to GU322651, GU322672 to GU322673, GU322677 to GU322678, GU322680 to GU322696, GU322704 to GU322705, GU322713 to GU322715, GU322719 to GU322720, HM568973 to HM569056; *efp*: FJ376236, FJ376238 to FJ376242, FJ376245, FJ376247, FJ376249, FJ376251 to FJ376252, FJ376254 to FJ376257, FJ376263, FJ376266, FJ376280 to FJ376281, FJ376293 to FJ376300, FJ376302 to FJ376317, FJ376321, FJ376323 to FJ376330, FJ376332 to FJ376346, FJ376348 to FJ376353, FJ376355 to FJ376357, FJ376359 to FJ376360, FJ376362, FJ376165, FJ376367 to FJ376368, FJ376375 to FJ376376, GU322551 to GU322566, GU322587 to GU322588, GU322592 to GU322593, GU322595 to GU322611, GU322619 to GU322620, GU322628 to GU322630, GU322634 to GU322635, HM569057 to HM569139; *gyrB*: EU015308 to EU015322, EU015324 to EU015340, EU015342 to EU015347,

EU015349 to EU015353, EU015357 to EU015360, EU015362, EU015367 to EU015370, EU015372 to EU015373, EU015380 to EU015384, EU015386, EU015388 to EU015396, EU015398 to EU015399, EU333910 to EU333912, FJ376185 to FJ376186, FJ376189, FJ376212, FJ376216, FJ376230 to FJ376233, GU322466 to GU322481, GU322502 to GU322503, GU322507 to GU322508, GU322510 to GU322526, GU322534 to GU322535, GU322543 to GU322545, GU322549 to GU322550, HM569140 to HM569223.

SUMMARY

MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) was used to measure the genetic relatedness of a comprehensive collection of xanthomonads pathogenic to solaneous plant species to *Xanthomonas* species and was compared to Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). The MLSA scheme was based on partial sequences for four housekeeping genes (*atpD*, *dnaK*, *efp* and *gyrB*). Distances derived from both techniques showed a close genetic relatedness of (i) *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. alfalfae* and (ii) *X. gardneri* and *X. cynarae*, consistent with other studies. Maximum likelihood tree topologies derived from each gene portion and the concatenated dataset for species in the *X. campestris* 16S rRNA core (i.e. the species cluster comprising all strains causing bacterial spot of tomato and pepper) were not congruent, consistent with the detection of several putative recombination events in our datasets. *X. gardneri* and *X. cynarae* were reported as the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper and bacterial bract spot of artichoke, respectively. Pathogenicity tests performed on these two *Xanthomonas* species indicated that they both have the ability to cause morphologically similar symptoms on tomato, pepper and artichoke and multiply in leaves at population sizes typical of compatible plant-bacteria interactions. This study provides an example where genetic similarities among groups of strains revealed by molecular techniques have unraveled previously unsuspected biological similarities in terms of phytopathological traits.

INTRODUCTION

Bacterial spot of tomato (*Solanum lycopersicum*) and pepper (*Capsicum* spp.) (BSTP) is an atypical and interesting xanthomonad-associated pathosystem because several *Xanthomonas* species cause similar disease facies on the same host species. Based on DNA:DNA hybridizations (DDH) and phenotypic tests, there are at present five species comprising strains causing bacterial spot of tomato and pepper. Until the 1990s, all strains responsible for bacterial spot were included in the taxon *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dye *et al.*, 1980). Vauterin *et al.* (1995) proposed *X. campestris* pv. *vesicatoria* to be separated in two

species, *X. vesicatoria* (phenotypic group B) and *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (phenotypic group A). Based on rep-PCR data, Rademaker *et al.* (2005) showed that these latter strains were members of the genetic cluster 9.2 of *X. axonopodis*. Jones *et al.* (2004) described two new additional species, *Xanthomonas gardneri* (phenotypic group D), and *X. perforans* (phenotypic group C) and renamed the A strains of *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* as *X. euvesicatoria*. In addition, Kuflu & Cuppels (1997) reported tomato strains of *X. campestris* pv. *raphani*.

In 1995, a global reclassification of the genus *Xanthomonas* by a polyphasic approach including DDH and carbon assimilation tests, following recommendations by Wayne *et al.* (1987), was proposed (Vauterin *et al.*, 1995), taking over the ‘phenotypic classification’ (Dye & Lelliott, 1974). Studies based on 16S rRNA gene sequences showed that most species, as determined by DDH, shared approximately 99 % sequence identity (Hauben *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997) and this technique is thus not suitable for delineation of most species. 16S rRNA gene sequencing identified three clusters within the *Xanthomonas* genus, namely the *X. campestris* core, *X. sacchari* and the *X. albilineans* core (Hauben *et al.*, 1997). Genotyping techniques, such as Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) positively correlated with DDH (Rademaker *et al.*, 2000). Recently, MultiLocus Sequence Analysis (MLSA) proved useful for assessing relatedness among *Xanthomonas* species (Young *et al.*, 2008). The use of these high-throughput techniques were recommended for bacterial taxonomy by the *ad hoc* committee for the re-evaluation of species definition in bacteriology (Stackebrandt *et al.*, 2002). In large studies based on rep-PCR, AFLP and MLSA aiming at describing the genetic relatedness among *Xanthomonas* species, the analysis of a very low number of BSTP-causing strains suggested a close relatedness between *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and other strains of *X. axonopodis* genetic cluster 9.2 (Parkinson *et al.*, 2007; Rademaker *et al.*, 2005; Young *et al.*, 2008). Similarly, recent MLSA data were indicative of synonymy between the type strain of *X. gardneri* and *X. cynarae* and suggested that the single heterogeneous group composed of these two species and *X. hortorum* is in need of further investigation (Young *et al.*, 2008).

The present paper had three main objectives. Firstly, we achieved a detailed genetic characterization based on AFLP and MLSA (based on *atpD*, *dnaK*, *efp* and *gyrB*) of a large strain collection of xanthomonads pathogenic to tomato and/or pepper and assessed their genotypic relatedness to type and pathotype strains in order to strengthen previous studies based on limited number of BSTP-causing strains. Secondly, we performed a thorough pathological characterization of BSTP-causing strains and their close genetic relatives that

had been reported as distinct species. Thirdly, primarily focusing on the *X. campestris* core cluster *sensu* Hauben *et al.* (1997) (i.e. the 16S rRNA cluster comprising all species causing bacterial spot of tomato and pepper), we estimated the congruence between datasets derived from each analyzed gene and how the structure of phylogenetic trees was influenced by recombination.

METHODS

Bacterial strains, media and DNA extraction. Bacterial strains used in this study are listed in Supplementary Table 1. Some strains included in this study were deposited in the Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP, INRA Angers, France), the IBSBF (Biological Institute Culture Collection of Phytopathogenic Bacteria, Instituto Biologico, Sao Paulo, Brazil), the ICMP (International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand), the BCCM/LMG (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms, University of Ghent, Belgium) and the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBP, CSL, York, United Kingdom). Other numbers refer to our laboratory collection. Cultures were stored freeze-dried and/or at -80°C in microbank tubes (Fisher Scientific). Most cultures were obtained on YPGA (yeast extract 7 g l⁻¹; peptone 7 g l⁻¹, glucose 7 g l⁻¹, agar 18 g l⁻¹, propiconazole 20 µg ml⁻¹, pH 7.2), incubated at 28°C for 3 to 6 days. Strains which grew poorly on YPGA were cultured on modified Wilbrink medium (Rott *et al.*, 1988). Single colonies were subcultured on YPGA for 24 h at 28°C. These subcultures were used to inoculate Yeast-Peptone broth tubes, which were incubated at 28°C under agitation for 16 to 18 h. These suspensions were then used for DNA extraction using the DNeasy[®] tissue kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. DNA concentrations were estimated spectrophotometrically (Nanodrop Technologies). When appropriate (Stall *et al.*, 1994), strains were checked for pectate degradation (Cuppels & Kelman, 1974) and starch hydrolysis ability (Vernière *et al.*, 1991). For this, small spots of culture originating from mass cultures on YPGA plates incubated at 28°C for 24 h were deposited on test media, which were grown at 28°C for 2-3 days. Marked depressions around culture spots on the CVP medium indicated pectate degradation. A large halo (i.e. radius > 1 cm) around culture spots on the starch-supplemented medium indicated starch hydrolysis.

AFLP analysis. AFLP experiments were performed in 96-well plates in a GeneAmp PCR system 9700 thermocycler (Applied Biosystems), as previously described (Ah-You *et al.*,

2007). Digestions of 100 ng of bacterial genomic DNA were carried out in a 25 μ L volume for 1 h at 37°C with, 10 U of *SacI*, 2 U of *MspI* (New England Biolabs), and 1X BSA in 1X reaction buffer NEB 1. Then 2.5 μ L of the digested products were added to 22.5 μ L of a ligation mix containing 2 μ M *MspI* adaptor (Supplementary Table 2), 0.2 μ M *SacI* adaptor (Supplementary Table 2) (Applied Biosystems), and 2 U of T4 DNA ligase (New England Biolabs) in 1X T4 DNA ligation buffer. Ligations were performed for 3 h at 37°C before enzyme inactivation at 65°C for 10 min. Ligation products were diluted 10-fold with HPLC-grade water before preselective PCR. The reactions were done in 15 μ L and contained 5 μ L of diluted ligation product, 2.5 mM MgCl₂, 0.23 μ M of each *MspI* and *SacI* primer (Supplementary Table 2), 0.45 mM of each dNTP (New England Biolabs), 0.5 U of Taq DNA polymerase (GoldstarTM Red, Eurogentec), in 1X Goldstar buffer. The following PCR conditions were used: initial extension to ligate the second strand of the adaptors at 72°C for 2 min, a denaturation step at 94°C for 2 min, 25 cycles at 94°C for 30 sec, 56°C for 30 sec, and 72°C for 2 min, and a final extension step at 72°C for 10 min. PCR products were diluted 10-fold with HPLC-grade water before selective amplification. The selective-amplifications using the unlabeled *MspI*+ A, C, T, or G primer and the labeled *SacI*+C primer (four different fluorochromes) (Supplementary Table 2) were performed in the same conditions as the preselective PCR except that the *SacI*+C primer concentration was 0.12 μ M. The following PCR conditions were used: initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 37 cycles at 94°C for 30 sec, annealing for 30 sec at 65°C for the first cycle, decreased by 0.7°C per cycle for the next 12 cycles, and then 56°C for the last 24 cycles, and extension at 72°C for 2 min with a final extension step at 72°C for 10 min. Samples were then prepared for capillary electrophoresis by adding 1 μ L of the final PCR product to 18.7 μ L of formamide and 0.3 μ L of GS500LIZ DNA ladder (Applied Biosystems) as an internal standard. The mixture was then denatured for 5 min at 95°C and placed on ice for at least 5 min. Electrophoresis was performed in an ABI PRISM-3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using performance optimized polymer POP-7 at 15,000 V for about 20 min at 60°C, with an initial injection of 69 seconds. The AFLP fingerprints were analyzed visually using Genemapper software 4.0 (Applied Biosystems). To test the reproducibility of the AFLP technique, two independent DNA extractions were used for all strains. The type strain of *X. euvesicatoria* (NCPBP 2968), *X. gardneri* (NCPBP 881), *X. perforans* (NCPBP 4321) and *X. vesicatoria* (LMG 911) were used as controls in each AFLP experiment.

The presence and absence of fragments were scored as a binary matrix. The threshold for assigning a peak was set to 500 relative fluorescence units. Evolutionary genome divergences (EGD) were calculated from Dice similarity indices and corrected to account for unobserved substitutions by using the standard Jukes-Cantor model, which assumes equal rates of substitution between all pairs of bases (Mougel *et al.*, 2002; Portier *et al.*, 2006). Corrected EGD values were used as distances to construct a weighted neighbor-joining tree (Gascuel, 1997; Saitou & Nei, 1987) using the R software (version 2.9.1; R Development Core team) and the APE package version 2.3 (Paradis *et al.*, 2004). The robustness of the trees was assessed with 1000 bootstrap replicates.

MLSA. Four gene portions, *atpD*, *dnaK*, *efp* and *gyrB*, (Ah-You *et al.*, 2009; Boudon *et al.*, 2005; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010) were amplified using the BD advantage 2 polymerase mix kit (Clontech), as recommended by the manufacturer, using primers shown in Supplementary Table 3. Amplifications were performed in a PE9600 thermocycler (Applied Biosystems) as follows: an initial denaturation at 95°C for 3 min was followed by 35 cycles of denaturation for 1 min at 95°C, annealing for 1 min at 66°C and extension for 1 min at 68°C and a final extension step at 68°C for 7 min. For a small number of strain-gene combinations, the annealing temperature was modified (63-68°C) for optimal PCR quality or yield. The amplicons were sequenced by Macrogen or Beckman Coulter Genomics (single-pass double-stranded analysis), using primers shown in Supplementary Table 3.

Phylogenetic analyses of housekeeping genes. The *atpD*, *dnaK*, *efp* and *gyrB* sequences from *Stenotrophomonas maltophilia* K279a (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_maltophilia/?decor=printable) were used as the outgroup for analyses aiming at comparing all *Xanthomonas* species. We used the type strain of *X. albilineans* (LMG 494) as the outgroup for analyses aiming at comparing species within the *X. campestris* core. DNA sequences for each gene portion were aligned using Clustal W-based sub-alignment tool (Thompson *et al.*, 1997) available in the MEGA 4.1 software (Tamura *et al.*, 2007). Tajima's D (Tajima, 1989), which tests the hypothesis that observed mutations are selectively neutral by measuring differences between the population mutation rates and the average number of nucleotides differences, was performed for each gene portion using DnaSP version 4.50.3 (Rozas *et al.*, 2003). The Nei and Gojobori method (Nei & Gojobori, 1986) was used for evaluating the rates of synonymous (Ks) and non synonymous (Ka) substitutions using MEGA 4.1. The nucleotide and amino acid identities and

transition/transversion ratios were also evaluated using MEGA 4.1. The mean nucleotide identity for each locus was calculated using the 'bio3d' package in R (Grant *et al.*, 2006). The detection of potential recombinant sequences, identification of likely parental sequences, and localization of possible recombination breakpoints were carried out with the dataset derived from each gene portion and the concatenated dataset by using a set of seven non-parametric detection programs, RDP (Martin & Rybicki, 2000), Geneconv (Padidam *et al.*, 1999), MaxChi (Maynard-Smith, 1992), Chimera (Posada & Crandall, 2001), bootscan (Martin *et al.*, 2005a), SiScan (Gibbs *et al.*, 2000) and 3Seq (Boni *et al.*, 2007), all available in the RDP3 software (Martin *et al.*, 2005b). The analysis was performed with default settings for the different detection methods and a Bonferroni corrected *P*-value cutoff of 0.05. Recombination events were accepted when detected with three detection methods or more. The breakpoint positions and recombinant sequence(s) inferred for every detected potential recombination event were visually checked and adjusted where necessary by using the extensive phylogenetic and recombination signal analysis features available in RDP3. After assessing the absence of saturation at each codon position using the Dambe software version 5.1.2 (Strimmer & Von Haeseler, 2003; Xia & Xie, 2001), the most suitable substitution model was determined for each gene using the 'ape' package with the R software, on the basis of both likelihood ratio tests (LRT) and the Akaike information criterion (AIC). Bootstrapped maximum likelihood trees (1000 resamplings) were then calculated for each dataset with PHYML (Guindon & Gascuel, 2003) using *X. albilineans* strain LMG 494 as the outgroup. The model of substitution was chosen using the R software and the 'ape' package implemented in R (Paradis, 2006). The Shimodaira-Hasegawa (S-H) method (Shimodaira & Hasegawa, 1999), as implemented in the 'phangorn' v 0.99.5 package in the R software, was used to test whether the tree topologies based on each locus fell within the same confidence limits. Similarly, a maximum likelihood tree was calculated as described above from amino acid sequences derived from the concatenated dataset. The most appropriate protein evolution model was determined using the ProtTest software (Abascal *et al.*, 2005). Because sequence data for which recombination events are detected are better represented by networks than trees, split networks derived from single gene data were computed with SplitsTree v4 using the neighbor-net algorithm (Huson & Bryant, 2006). The robustness of the networks was assessed by bootstrap (1000 resamplings), but these were not represented graphically for an improved clarity of related figures.

Pathogenicity tests. Firstly, these assays aimed at estimating the pathogenicity of strains that were received from culture collections as BSTP-causing strains and that were found genetically unrelated to known taxa associated with this disease by AFLP (i.e. EGD values > 0.10). For this we compared these atypical strains (CFBP 3277, ICMP 1642, ICMP 7464, ICMP 9082, NCPPB 975 and NCPPB 2044) and the type (or pathotype) strain of the five *Xanthomonas* species causing bacterial spot disease for pathogenicity. Solanaceous species used for pathogenicity tests included tomato (*Solanum lycopersicum*) cv. Marmande and pepper (*Capsicum annuum*) cvs. Yolo wonder and Aiguille.

Secondly, we evaluated the pathogenicity of strains of valid species that were closely related to BSTP-causing strains as described above. The type strain of *X. alfalfae* (LMG 495) was compared for pathogenicity to the type strain of *X. euvesicatoria* and *X. perforans*. Similarly, we compared the pathogenicity of three strains of *X. gardneri* (NCPPB 881, ICMP 1620 and ICMP 7383), three strains of *X. cynarae* (CFBP 4182, CFBP 4188 and CFBP 4209) and the type strain of *X. hortorum* (LMG 733) on solaneous species as described above and on artichoke (*Cynara scolymus*) cv. violet de Provence.

Finally, we evaluated the pathogenicity of strains from tomato that were genetically related to *X. campestris* (ICMP 110, LMG 927 and LMG 10429), which were compared to three strains of *X. campestris* pv. *raphani* (CFBP 5827, CFBP 5828 and CFBP 5829). Assayed solaneous species were as described above. In addition, tests were also performed on radish (*Raphanus sativus*) cv. rond Gaudry 2 and kocto.

Bacterial suspensions containing approximately 1×10^5 cfu ml⁻¹ were obtained by tenfold dilutions in sterile 0.01M Tris buffer (pH 7.2) of spectrophotometrically adjusted suspensions (0.05 OD at 600 nm $\approx 1 \times 10^8$ cfu ml⁻¹) prepared from 18 hour-old cultures on YPGA. Sterile Tris buffer was used as inoculum for negative controls. Suspensions were infiltrated (0.3 - 0.4 cm²) into the abaxial side of the mesophyll of young leaves. For each strain, six inoculation points were performed on one leaf on three different plants. Plants were placed in growth chambers at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ day and $26 \pm 1^\circ\text{C}$ night and 80 ± 5 % relative humidity for 25 days with a photoperiod of 12 hours. Leaves were checked daily for lesion development and population sizes were determined at the end of experiments from at least six lesions using a Spiral System device (Interscience) on a semi-selective medium (KC or NCTM1) that gave a suitable growth of the studied strains (Pruvost *et al.*, 2005; Roumagnac *et al.*, 2000). Bacterial population sizes were based on enumeration of *Xanthomonas*-like colonies. All experiments were replicated at least once.

The procedure for evaluating the pathogenicity of strains identified or received as *X. campestris* from tomato and *X. campestris* pv. *raphani* consisted in spray-inoculations to radish as reported by Fargier and Manceau (2007).

Bacterial population sizes were log-transformed to stabilize sample variances prior to statistical analysis using the R statistical package. The Bartlett test used for assessing variance homogeneity indicated that this criterion was not met for some data sets. Therefore, non-parametric tests (Kruskal-Wallis and Wilcoxon-Mann-Whitney tests) were performed. For the latter test, adjusted *p*-values for multiple comparisons were calculated using the Benjamini and Holberg's method (Benjamini & Hochberg, 1995).

RESULTS

AFLP analysis. Eight hundred and two AFLP fragments were used for computation of EGDs. Among strains received from international culture collections as causing bacterial spot on tomato and/or pepper, six strains (CFBP 3277, ICMP 1642, ICMP 7464, ICMP 9082, NCPPB 975 and NCPPB 2044) were markedly different from the type strains of *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* or the pathotype strain of *X. campestris* pv. *raphani* with EGD values > 0.10 nucleotide substitutions per site (nsps). They also were not pathogenic to tomato or pepper (data not shown). These strains were not considered further in the present study.

The NJ tree presenting the genetic relatedness between the five species associated with bacterial spot of tomato and pepper and closely related species is shown in Fig. 1.

X. vesicatoria strains were distantly related to all type strains of other valid *Xanthomonas* species, with EGD values > 0.12 nsps (Table 1). The maximum intra-species diversity estimated for *X. vesicatoria* was 0.0375. A robust structure was shown for *X. vesicatoria*, leading to the identification of five groups of strains (Supplementary Fig. 1).

EGD values between strains of *X. euvesicatoria* and *X. perforans* and the type strain of *X. axonopodis*, ranged from 0.1088 to 0.1319, suggested only a distant relatedness among them (Table 1). In contrast, strains of *X. euvesicatoria* and *X. perforans* were closely related one to each other ($0.0376 < \text{EGD} < 0.0528$ nsps) and to the *X. alfalfae* type strain ($0.0305 < \text{EGD} < 0.0470$ nsps). The *X. euvesicatoria*-*X. perforans* complex was structured in three robust groups of strains (Supplementary Fig. 2). The first group comprising the type

strain of *X. euvesicatoria* and most of other strains previously classified as *X. axonopodis* pv. *vesicatoria sensu* Vauterin *et al.* (1995). The second group contained previously poorly characterized strains originating from India or recently isolated in Grenada. The third group corresponded to *X. perforans*. Strains from India and Grenada were more closely related to the type strain of *X. euvesicatoria* than *X. perforans* with EGD values of 0.0244 (sd = 0.0008) and 0.0407 (sd = 0.0005) nsps, respectively.

Strains of *X. gardneri* were closely related to the *X. cynarae* type strain ($0.0205 < \text{EGD} < 0.0317$ nsps) and to a lesser extent to the *X. hortorum* type strain ($0.0739 < \text{EGD} < 0.0834$ nsps) (Table 1). One strain of *X. gardneri* (ICMP 7383) was markedly different from the other *X. gardneri* strains (Supplementary Fig. 3). *X. gardneri* strains were more closely related to *X. cynarae* ($0.0205 < \text{EGD} < 0.0276$) than to strain ICMP 7383 ($0.0284 < \text{EGD} < 0.0340$).

Finally, three strains isolated from tomato and originating from the USA (ICMP110 and LMG10429) and Zambia (LMG927) received as *X. campestris* pv. *vesicatoria* were distantly related to all *Xanthomonas* type strains ($\text{EGD} > 0.12$ nsps) but *X. campestris*. Within the *X. campestris* species, the tomato strains from the USA were most closely related to *X. campestris* pv. *raphani* with EGD values ranging from ca. 0.01 to 0.05 nsps).

MLSA. All strains (Supplementary Table 1) produced amplicons, whatever the gene portion assayed. Short DNA insertions/deletions were identified for a few species on each locus. On *atpD*, a 21 bp insertion was detected only for *X. sacchari* strains starting at position 597 (nucleotide numbering as in data collected from the *atpD* sequence derived from the complete genome sequence of *X. euvesicatoria* strain 85-10). On *dnaK*, a 3 bp insertion was detected for *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens* and *Stenotrophomonas maltophilia* strains starting at position 556. On *efp*, 3 bp deletions were detected for *X. axonopodis* pv. *syngonii* and *X. populi* strains, starting at position 435 and 441, respectively. Finally, a 3 bp insertion was detected for *X. albilineans*, *X. sacchari* and *S. maltophilia* starting at position 622 on the *gyrB* gene portion.

The number of alleles ranged from 61 (*efp*) to 79 (*dnaK*) (Table 2). The GC content for all loci ranged from 63.1 to 64.5 %. The nucleotidic diversity per site ranged from 0.0445

(*dnaK*) to 0.0715 (*gyrB*). The nucleotide transitions exceeded transversions. All genes showed an average $Ka/Ks \ll 1$, indicating that they were subject to stabilizing selection, conforming to the general requirements of MLSA. Stabilizing selection was further suggested by Tajima's D values for all genes (Table 2).

Consistent with AFLP data, five different STs (Sequence Type) were identified within *X. vesicatoria* (V1 to V5), two within *X. euvesicatoria* (E1 and E2), and two within *X. gardneri* (G1 and G2) based on concatenated data (Supplementary Table 1; Supplementary Fig. 1, Supplementary Fig. 2, Supplementary Fig. 3).

We first reconstructed the *Xanthomonas* phylogeny using SplitTree and our concatenated dataset (not shown). More than representing the phylogenetic relationships between strains, this network aimed at estimating the degree of reticulate evolution (i.e. recombination in the context of *Xanthomonas*). The less a network is tree-like, the more recombination may have been involved during evolution of the related sequences. The neighbor-net reconstruction suggested that *Xanthomonas* phylogeny is not fully resolved with a simple tree and that recombination may have occurred during its evolution. Consequently, we then included the concatenated sequences of all strains (Supplementary Table 1) for a recombination detection analysis. Fourteen putative recombination events (RE) were detected by at least three algorithms confirming the results obtained with the preliminary neighbor-net analysis. Among these, three REs involved *X. sacchari* and seven involved species belonging to the *X. albilineans* core *sensu* Hauben *et al.* (1997) and involved all four gene portions (data not shown). These REs primarily hindered the description of genetic relatedness among *X. albilineans*, *X. hyacinthi*, *X. sacchari*, *X. theicola*, *X. translucens* and *S. maltophilia*. Nevertheless, despite these REs, none of these species did cluster with species in the *X. campestris* core (data not shown). As most (10/14) recombination events suggested horizontal gene transfers for *X. sacchari* and species of the *X. albilineans* core, these species were omitted for subsequent phylogenetic analyses. A second recombination detection analysis was performed with a dataset containing only strains of the *X. campestris* core and putative REs detected using both datasets are presented in Table 3. A total of seven REs were detected on three gene portions (*atpD*, *dnaK* and *gyrB*) with the concatenated dataset. All REs but one were not detected when the search for recombination was done using single-gene datasets. Interestingly, a recombination event in the *atpD* gene portion with estimated beginning and ending breakpoints estimated at position 1 and 536, respectively, was detected

when using all datasets for sequence type (ST) E1 of *X. euvesicatoria* (Supplementary Table 1). Although distantly related ($d = 0.0558$), the closest species was identified as *X. melonis* based on the alignment of the recombinant region (Fig. 2). In contrast, all strains of *X. euvesicatoria* were closely related to *X. perforans* and *X. alfalfae* based on the neighbor-net networks derived from the alignment of the three other gene portions (Figs. 3 to 5), consistent with AFLP data.

Datasets derived from each gene portion as well as the concatenated dataset best followed the general time reversible (GTR) model with gamma (Γ) variations and a proportion of invariable sites (I). Significant differences in the likelihood of the tree topologies derived from most datasets was shown using S-H tests (Table 4), consistent with the putative REs that were detected. When compared to the concatenated dataset, only trees derived from *dnaK* and *gyrB* produced congruent topologies ($P > 0.05$). ML trees for single gene portions (not shown) consistently revealed a close relatedness (but a lack of identity) between *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. alfalfae*, except for *atpD*, consistent with the RE that was detected for *X. euvesicatoria* ST E1 (Supplementary Table 4). Peptide sequences derived from the concatenated dataset of strains of *X. axonopodis sensu* Vauterin *et al.* (1995) had similarities $> 99\%$. The longest branch in this group concerned *X. euvesicatoria* ST E1 consistent with the recombination event detected on *atpD* for this group of strains (Supplementary Fig. 4).

Consistent with AFLP data, *X. gardneri* and *X. cynarae* were closely related. Genetic distances within these two species ranged from 0.0000 to 0.0158 (Supplementary Table 5). Distances between the *X. gardneri*-*X. cynarae* species and *X. hortorum* ranged from 0.0119 to 0.0360. Peptide sequences derived from the concatenated dataset of strains of the *X. gardneri* and *X. cynarae* were fully identical. Their similarity to *X. hortorum* was $> 99\%$ (Supplementary Fig. 4).

Pathogenicity tests. *X. alfalfae* strain LMG 495, *X. hortorum* strain LMG 733 and all genetically atypical strains received as BSTP-causing strains were not pathogenic to any assayed solaneous species. All other assayed strains were pathogenic to at least one solaneous host. Lesions first appeared as small water-soaked spots that enlarged slightly and became necrotic over time, whatever the inoculated plant species. The type strain of *X. perforans* and *X. vesicatoria* were only pathogenic to tomato. Lesions on inoculated leaves

were first observed four to five days after inoculation (dai) for both species. On the basis of four independent experiments, mean *Xanthomonas* population sizes recovered from leaf lesions ranged from 5×10^6 to 1×10^7 and from 1×10^6 to 6×10^7 cfu per lesion for *X. perforans* and *X. vesicatoria*, respectively. No visible symptom or HR-like reaction was observed on either of the pepper cultivars for these two bacterial species. The type strain of *X. euvesicatoria* produced lesions on tomato cv. Marmande and pepper cv. Yolo wonder, but no lesion or HR-like reaction was visible on cv. Aiguille. Leaf lesions started to develop four to 12 and four to seven dai on tomato and Yolo wonder pepper, respectively. Mean *Xanthomonas* population sizes recovered from leaf lesions for the type strain of *X. euvesicatoria* were 9×10^6 and 7×10^7 cfu per lesion for tomato and pepper cv. Yolo wonder, respectively.

Leaves of tomato, pepper and artichoke inoculated with strains of *X. gardneri* and *X. cynarae* produced lesions three to 11 dai (Table 5) but no lesion was observed for the type strain of *X. hortorum* whatever the plant species. Lesions consisted of small watersoaked areas turning into necrotic spots. All inoculated strains markedly multiplied in leaf tissues whatever the host species (Table 5). On artichoke, no clear-cut difference in the morphology of lesions or the length of the latent infection period was observed among strains submitted to inoculation. Mean *Xanthomonas* population sizes per lesion ranged from 9×10^6 to 3×10^7 cfu per lesion, suggesting that both *X. cynarae* and *X. gardneri* interacted with this host species in a compatible manner. Although significant differences in population sizes were recorded ($P = 0.0007$) among strains, data did not suggest marked differences between *X. cynarae* and *X. gardneri* (Table 5). On solaneous species, *X. gardneri* strains tended to multiply in leaf lesions at larger population sizes than *X. cynarae*. These differences in population sizes although statistically significant were most often by less than one log unit (Table 5). The main exception to this tendency was strain ICMP 7383 on pepper cv. Aiguille, whose population sizes were statistically lower than that of *X. cynarae* and other strains of *X. gardneri* (Table 5).

When spray-inoculated to radish, strains from tomato identified as *X. campestris* (ICMP 110, LMG 927 and LMG 10429) produced typical leaf lesions (i.e. small circular black spots which turned necrotic with their central part becoming collapsed), as did *X. campestris* pv. *raphani* strains (CFBP 5827, CFBP 5828 and CFBP 5829). Similarly, *X. campestris* strains isolated from tomato and *X. campestris* pv. *raphani* produced lesions on tomato and pepper that were morphologically similar to those reported for other species causing BSTP. However, mean *Xanthomonas* population sizes recovered from such lesions were rather low,

typically ranging from 1×10^5 to 1×10^6 cfu per lesion whatever the inoculated host species (the sole exception being strain ICMP 110 on pepper cv. Aiguille with mean *Xanthomonas* population sizes of 1×10^7 cfu per lesion).

DISCUSSION

The first objective of the present study was to achieve a detailed genetic characterization based on AFLP and MLSA of a comprehensive collection of strains causing bacterial spot of tomato and pepper and assess their genotypic relatedness to type and pathotype strains. Both techniques are complementary in the sense that AFLP generates a large number of randomly located markers over the whole genome, while MLSA targets portions of housekeeping genes but allows the analysis of phylogenetic relationships of large sets of strains with a better portability than genotyping techniques such as AFLP.

Both AFLP and MLSA delineated the *X. vesicatoria* species and no type strain of any valid species was found closely related to it, consistent with previous studies (Jones *et al.*, 2004; Louws *et al.*, 1995; Rademaker *et al.*, 2000; Rademaker *et al.*, 2005). When compared to previous data for which AFLP distances (i.e. EGD using the same conditions as in the present study) and thermal stability of DNA reassociation were analyzed, EGDs between *X. vesicatoria* and other *Xanthomonas* species corresponded to $\Delta T_{ms} > 7.0^\circ\text{C}$ (Ah-You *et al.*, 2009). In contrast, AFLP distances (EGD) between strains of *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. alfalfae* were comparable to those between *X. citri* pv. *citri* and *X. citri* pv. *mangiferaeindicae*, which corresponded to $\Delta T_{ms} \leq 2.0^\circ\text{C}$ (Ah-You *et al.*, 2009). When excluding regions for which recombination was detected, distances derived from MLSA between *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. alfalfae* and pathovars classified as *X. axonopodis* genetic cluster 9.2 were markedly lower than the 5 % average nucleotide divergence for shared genes proposed by Goris *et al.* (2007) as a correspondence to the 70 % DDH cut-off (Wayne *et al.*, 1987). Similarly, we showed that *X. gardneri* strains were closely related to the type strain of *X. cynarae*, with AFLP distances corresponding to $\Delta T_{ms} < 1.0^\circ\text{C}$ (Ah-You *et al.*, 2009) and MLSA distances markedly lower than the 5 % average nucleotide divergence for shared genes (Goris *et al.*, 2007). The genetic relatedness between *X. hortorum* and the *X. gardneri* and *X. cynarae* species highlighted by our AFLP data suggest that they may correspond to ΔT_m values around the 5.0°C threshold (Ah-You *et al.*, 2009). A polyphasic taxonomic analysis of *X. hortorum* and related species should be undertaken.

Thus, our results fully confirm previous housekeeping gene sequence data suggesting synonymy between (i) *X. euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. alfalfae*, and (ii) *X. gardneri* and

X. cynarae (Parkinson *et al.*, 2007; Parkinson *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2008). The divergence in conclusions between these studies, including ours, and the ones by Jones *et al.* (2004) and Schaad *et al.* (2005) can be explained in two ways. Firstly, no strain of *X. cynarae* was included in the DDH experiments that aimed at redefining *Xanthomonas* species associated with bacterial spot of tomato and pepper (Jones *et al.*, 2004). Secondly, no strain of *X. euvesicatoria* and *X. perforans* was included in the reclassification study by Schaad *et al.* (2005) that led to the proposal of *X. alfalfae*.

As a second objective, we studied the pathogenicity of strains that were closely related to species comprising strains causing bacterial spot of tomato and pepper. Interestingly, based on lesion morphology, dynamics of lesion development over time and *Xanthomonas* population sizes in lesions, we suggest that strains of *X. cynarae* and *X. gardneri* produced compatible interactions (i.e. disease, not hypersensitivity) when inoculated to solaneous species or artichoke. This is to our knowledge the first report of pathological similarities between these two groups of strains. Our data suggested a tendency that strains originating from solaneous host species produce larger population sizes when inoculated to such species rather than to a heterologous host (i.e. artichoke). Field data on epidemic fitness and cross-infection capability of strains originating from artichoke and solaneous species would be necessary to gain further knowledge on pathological relatedness between both groups of strains. The relatively broad host range of *X. cynarae-gardneri* is somehow atypical of the high pathological specialization most often reported for xanthomonads (Hayward, 1993). However a few cases of a broader host range involving solaneous species have been documented for bacterial pathogens, e.g. *X. campestris* pv. *raphani* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Fargier & Manceau, 2007; White, 1930; Yan *et al.*, 2008). Nevertheless, this comparative analysis between *X. cynarae* and *X. gardneri* is an interesting example where genetic similarities among groups of strains brought up by molecular techniques with a higher throughput than DDH have unraveled previously unsuspected biological similarities in terms of phytopathological characteristics.

Our third objective was to estimate the congruence between tree topologies derived from *atpD*, *dnaK*, *efp* and *gyrB* sequence data for the *X. campestris* core cluster *sensu* Hauben *et al.* (1997) (i.e. the 16S rRNA cluster comprising all species causing bacterial spot of tomato and pepper) and how the structure of phylogenetic trees was influenced by recombination. Our MLSA scheme allowed typing of all strains of all *Xanthomonas* species at all four selected loci. The good overall congruence between AFLP clusters and MLSA STs for xanthomonads causing BSTP suggests that our MLSA scheme is globally efficient at accurately assigning

strains at the species and infra-species levels. MLSA tree topologies resolved genetic clusters of *X. axonopodis* in agreement with rep-PCR and AFLP data (Rademaker *et al.*, 2000). These genetic clusters were characterized by levels of DDH in a range of 60-75 % as described by Vauterin *et al.* (1995). In contrast, we show that the genetic relatedness between more distantly related species is revealed in a gene-dependent manner. Based on S-H tests of maximum likelihood tree topologies and the detection of several putative recombination events, our results showed a lack of congruence between phylogenies derived from the four assayed gene portions. When used as the reference tree, the concatenated tree was not congruent with any of the four trees derived from individual genes. Our results contrast with conclusions brought up by Young *et al.* (2008) using different gene portions and analytical approach. These differences may be due to the different approaches that have been used for analyzing congruence among tree topologies. When we applied the analytical approach described in the present study for detection of recombination on single gene and concatenated data by Young *et al.* (2008) (extracted from Genbank), several significant recombination signals were detected by three or more algorithms implemented in RDP (data not shown). Similarly, S-H tests applied to data by Young *et al.* (2008) indicated a lack of congruence of maximum likelihood tree topologies (data not shown).

Our results therefore suggest occasional horizontal gene transfers and recombination of housekeeping genes during the evolutionary histories of xanthomonads. Such an hypothesis is consistent with previous data suggesting that relatively high rates of genes acquired by horizontal transfer in the order Xanthomonadales (Comas *et al.*, 2006). A phylogenetic analysis of core gene sets of gamma-proteobacteria showed that at least 10 % of these core genes have likely been laterally transferred during the divergence of this class (Susko *et al.*, 2006). The distorting effects of recombination should be taken into account when assigning *Xanthomonas* strains to existing or new species using MLSA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank P. Prior, C. Vernière, L. Costet and V. Grimault for helpful discussion and/or manuscript review before submission, D. Cuppels and P. Prior for providing us with bacterial strains and C. Boyer, W. Grondin, A. Laurent, V. Ledoux, M. Payet and K. Vital for technical assistance. The European Regional Development Fund (ERDF) of the European Union, Conseil Régional de La Réunion and CIRAD provided financial support.

REFERENCES

Abascal, F., Zardoya, R. & Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**, 2104-2105.

Ah-You, N., Gagnevin, L., Chiroleu, F., Jouen, E., Neto, J. R. & Pruvost, O. (2007). Pathological variations within *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* support its separation into three distinct pathovars that can be distinguished by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Phytopathology* **97**, 1568-1577.

Ah-You, N., Gagnevin, L., Grimont, P. A. D. & other authors (2009). Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to Anacardiaceae and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 306-318.

Barker, F. K. & Lutzoni, F. M. (2002). The utility of the incongruence length difference test. *Syst Biol* **51**, 625-637.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B* **57**, 289-300.

Boni, M. F., Posada, D. & Feldman, M. W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* **176**, 1035-1047.

Boudon, S., Manceau, C. & Notteghem, J. L. (2005). Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* **95**, 1081-1088.

Bui Thi Ngoc, L., Vernière, C., Jouen, E., Ah-You, N., Lefeuvre, P., Chiroleu, F., Gagnevin, L. & Pruvost, O. (2010). Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 515-525.

Comas, I., Moya, A., Azad, R. K., Lawrence, J. G. & Gonzalez-Candelas, F. (2006). The evolutionary origin of Xanthomonadales genomes and the nature of the horizontal gene transfer process. *Mol Biol Evol* **23**, 2049-2057.

Cuppels, D. & Kelman, A. (1974). Evaluation of selective media for isolation of soft - rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* **64**, 468-475.

Darlu, P. & Lecointre, G. (2002). When does the incongruence length difference test fail ? *Mol Biol Evol* **19**, 432-437.

Doidge, E. M. (1921). A tomato canker. *Ann Appl Biol* **7**, 407-430.

Dowson, W. J. (1939). On the systematic position and generic names of the Gram negative bacterial plant pathogens. *Zentralbl Bakteriell Parasitenk Infect* **2**, 177-193.

Dye, D. W., Bradbury, J. F., Goto, M., Hayward, A. C., Lelliott, R. A. & Schroth, M. N. (1980). International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev Plant Pathol* **59**, 153-168.

Dye, D. W. & Lelliott, R. A. (1974). Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939, 187. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, pp. 243-249. Baltimore: Williams & Wilkins.

Fargier, E. & Manceau, C. (2007). Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol* **56**, 805-818.

Gascuel, O. (1997). Concerning the NJ algorithm and its unweighted version UNJ. In *Mathematical hierarchies and biology*, pp. 149-171. Edited by B. Mirkin, F. R. McMorris, F. Roberts & A. Rzhetsky. Providence, RI, USA: American Mathematical Society.

Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G. & other authors (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev Microbiol* **3**, 733-739.

Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. & Gibbs, A. J. (2000). Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* **16**, 573-582.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 81-91.

Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., El Sawy, K. M., McCammon, J. A. & Caves, L. S. D. (2006). Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **22**, 2695-2696.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.

Gurtler, V. & Mayall, B. C. (2001). Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 3-16.

Hanage, W. P., Fraser, C. & Spratt, B. G. (2006). Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil Trans R Soc B* **361**, 1917-1927.

Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J. & Moore, E. R. B. (1997). Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 328-335.

Hayward, A. C. (1993). The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*, pp. 1-119. Edited by J. G. Swings & E. L. Civerolo. London: Chapman & Hall.

Huson, D. H. & Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* **23**, 254-267.

Jones, J. B., Lacy, G. H., Bouzar, H., Stall, R. E. & Schaad, N. W. (2004). Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst Appl Microbiol* **27**, 755-762.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111-120.

Kuflu, K. M. & Cuppels, D. A. (1997). Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4462-4470.

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. & Debruijn, F. J. (1995). Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* **85**, 528-536.

Martin, D. & Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* **16**, 562-563.

Martin, D. P., Posada, D., Crandall, K. A. & Williamson, C. (2005a). A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retrovir* **21**, 98-102.

Martin, D. P., Williamson, C. & Posada, D. (2005b). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**, 260-262.

Maynard-Smith, J. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* **34**, 126-129.

Moore, E. R. B., Kruger, A. S., Hauben, L., Seal, S. E., De Baere, R., De Wachter, R., Timmis, K. N. & Swings, J. (1997). 16S rRNA gene sequence analyses and inter- and intrageneric relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol Letters* **151**, 145-153.

Mougel, C., Thioulouse, J., Perrière, G. & Nesme, X. (2002). A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 573-586.

Nei, M. & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol* **3**, 418-426.

Padidam, M., Sawyer, S. & Fauquet, C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* **265**, 218-225.

Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**, 289-290.

Paradis, E. (2006). *Analysis of phylogenetics and evolution with R*. New York, NY (USA): Springer.

Parkinson, N., Aritua, V., Heeney, J., Cowie, C., Bew, J. & Stead, D. (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2881-2887.

Parkinson, N., Cowie, C., Heeney, J. & Stead, D. (2009). Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 264-274.

Portier, P., Fischer-Le Saux, M., Mougel, C., Lerondelle, C., Chapulliot, D., Thioulouse, J. & Nesme, X. (2006). Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7123-7131.

Posada, D. & Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 13757-13762.

Pruvost, O., Roumagnac, P., Gaube, C., Chiroleu, F. & Gagnevin, L. (2005). New media for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae*, the causal agent of mango bacterial black spot. *J Appl Microbiol* **99**, 803-815.

Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. & De Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic

fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 665-677.

Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., Schultz, M. H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & De Bruijn, F. J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* **95**, 1098-1111.

Rott, P., Chatenet, M., Granier, M. & Baudin, P. (1988). L'échaudure des feuilles de canne à sucre provoquée par *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson. II - Diagnostic et spectre d'hotes de l'agent pathogene en Afrique tropicale. *Agron Trop* **43**, 244-251.

Roumagnac, P., Gagnevin, L. & Pruvost, O. (2000). Detection of *Xanthomonas* sp., the causal agent of onion bacterial blight, in onion seeds using a newly developed semi-selective isolation medium. *Eur J Plant Pathol* **106**, 867-877.

Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P. & Pruvost, O. (2004). Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 15-24.

Rozas, J., Sanchez-Del Barrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**, 2496-2497.

Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K. (2005). Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.;

and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **28**, 494-518.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G. H., Sechler, A., Agarkova, I., Stromberg, P. E., Stromberg, V. K. & Vidaver, A. K. (2006). Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst Appl Microbiol* **29**, 690-695.

Shimodaira, M. & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol Biol Evol* **16**, 1114-1116.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M. & other authors (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043-1047.

Stall, R. E., Beaulieu, C., Egel, D. & other authors (1994). Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 47-53.

Strimmer, K. & Von Haeseler, A. (2003). Nucleotide substitution models. In *The phylogenetic handbook*, pp. 72-100. Edited by M. Salemi & A. M. Vandamme. Cambridge: Cambridge University Press.

Susko, E., Leigh, J., Doolittle, W. F. & Baptiste, E. (2006). Visualizing and assessing phylogenetic congruence of core gene sets: a case study of the gamma-proteobacteria. *Mol Biol Evol* **23**, 1019-1030.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Thieme, F., Koebnik, R., Bekel, T. & other authors (2005). Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol* **187**, 7254-7266.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The clustal x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.

Trébaol, G., Gardan, L., Manceau, C., Tanguy, J. L., Tirilly, Y. & Boury, S. (2000). Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* : a new species causing bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1471-1478.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. & Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 472-489.

Vernière, C., Devaux, M., Pruvost, O., Couteau, A. & Luisetti, J. (1991). Studies on the biochemical and physiological variations among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, the causal agent of citrus bacterial canker disease. *Fruits* **46**, 162-170.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & other authors (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation on approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.

White, H. E. (1930). Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* **20**, 653-662.

Xia, X. & Xie, Z. (2001). DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* **92**, 371-373.

Yan, S., Liu, H., Mohr, T. J., Jenrette, J., Chiodini, R., Zaccardelli, M., Setubal, J. C. & Vinatzer, B. A. (2008). Role of recombination in the evolution of the model plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, a very atypical tomato strain. *Appl Environ Microbiol* **74**, 3171-3181.

Young, J. M., Park, D. C., Shearman, H. M. & Fargier, E. (2008). A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 366-377.

Table 1. Genetic relatedness based on AFLP data between *X. euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans*, *X. vesicatoria* and type strains of valid *Xanthomonas* species.

Strain number	Species name	<i>X. euvesicatoria</i> (n = 85)	<i>X. gardneri</i> (n = 25)	<i>X. perforans</i> (n = 1)	<i>X. vesicatoria</i> (n = 38)
LMG 494 [*]	<i>X. albilineans</i>	0.2287 [†] (0.0152)	0.2052 (0.0087)	0.2133 (NA)	0.1589 (0.0053)
LMG 495 [*]	<i>X. alfalfae</i> (cluster 9.2) [‡]	0.0377 (0.0035)	0.1631 (0.0083)	0.0392 (NA)	0.1583 (0.0097)
LMG 747 [*]	<i>X. arboricola</i>	0.1332 (0.0062)	0.1335 (0.0024)	0.1337 (NA)	0.1771 (0.0124)
LMG 982 [*]	<i>X. axonopodis</i> (cluster 9.3) [‡]	0.1175 (0.0046)	0.1662 (0.0073)	0.1200 (NA)	0.1682 (0.0107)
LMG 947 [*]	<i>X. bromi</i>	0.1307 (0.0057)	0.1431 (0.0053)	0.1550 (NA)	0.1478 (0.0069)
LMG 568 [*]	<i>X. campestris</i>	0.1509 (0.0045)	0.1252 (0.0066)	0.1638 (NA)	0.1426 (0.0077)
LMG 673 [*]	<i>X. cassavae</i>	0.1632 (0.0045)	0.1456 (0.0035)	0.1783 (NA)	0.1449 (0.0039)
LMG 9322 [*]	<i>X. citri</i> (cluster 9.5) [‡]	0.1267 (0.0062)	0.1594 (0.0037)		0.1672 (0.0055)
LMG 8678 [*]	<i>X. codiae</i>	0.1408 (0.0048)	0.1544 (0.0050)	0.1125 (NA)	0.1562 (0.0051)
LMG 690 [*]	<i>X. cucurbitae</i>	0.1173 (0.0055)	0.1798 (0.0057)	0.1473 (NA)	0.1448 (0.0043)
CFBP 4188 [*]	<i>X. cynarae</i>	0.1538 (0.0062)	0.0244 (0.0020)	0.1165 (NA)	0.1543 (0.0041)

NCPBP 2968 *	<i>X. euvesicatoria</i> (cluster 9.2) [‡]	0.0134 (0.0046)	0.1340 (0.0078)	0.0454 (NA)	0.1503 (0.0058)
LMG 708 *	<i>X. fragariae</i>	0.1507 (0.0059)	0.1563 (0.0054)	0.1770 (NA)	0.1995 (0.0170)
LMG 826 *	<i>X. fuscans</i> (cluster 9.6) [‡]	0.1121 (0.0061)	0.1710 (0.0063)	0.1115 (NA)	0.1431 (0.0101)
NCPBP 881 *	<i>X. gardneri</i>	0.1362 (0.0071)	0.0071 (0.0056)	0.1609 (NA)	0.1495 (0.0030)
LMG 733 *	<i>X. hortorum</i>	0.1495 (0.0047)	0.0782 (0.0021)	0.1652 (NA)	0.1284 (0.0049)
LMG 739 *	<i>X. hyacinthi</i>	0.1826 (0.0233)	0.1594 (0.0042)	0.1882 (NA)	0.1825 (0.0148)
LMG 8670 *	<i>X. melonis</i>	0.1365 (0.0070)	0.1848 (0.0096)	0.1363 (NA)	0.1502 (0.0087)
LMG 5047 *	<i>X. oryzae</i>	0.1572 (0.0065)	0.1891 (0.0064)	0.1962 (NA)	0.1312 (0.0034)
NCPBP 4321 *	<i>X. perforans</i> (cluster 9.2) [‡]	0.0457 (0.0035)	0.1554 (0.0060)	NA	0.1605 (0.0078)
LMG 847 *	<i>X. pisi</i>	0.1417 (0.0051)	0.1938 (0.0069)	0.1523 (NA)	0.1340 (0.0058)
LMG 5743 *	<i>X. populi</i>	0.1336 (0.0052)	0.1109 (0.0033)	0.1494 (NA)	0.1562 (0.0049)
LMG 471 *	<i>X. sacchari</i>	0.2446 (0.0217)	0.1919 (0.0094)	0.2494 (NA)	0.1854 (0.0068)
LMG 8684 *	<i>X. theicola</i>	0.1360 (0.0055)	0.1437 (0.0055)	0.1615 (NA)	0.1498 (0.0089)

LMG 876 [*]	<i>X. translucens</i>	0.1805 (0.0105)	0.1980 (0.0094)	0.1760 (NA)	0.1936 (0.0110)
LMG 736 [*]	<i>X. vasicola</i>	0.1575 (0.0061)	0.1515 (0.0052)	0.1655 (NA)	0.1487 (0.0076)
LMG 911 [*]	<i>X. vesicatoria</i>	0.1499 (0.0063)	0.1428 (0.0067)	0.1633 (NA)	0.0117 (0.0104)

NA: not appropriate.

^{*} Type strain.

[†] Data are evolutionary genome divergences (EGD) (Mougel *et al.*, 2002) based on four combined AFLP conditions. Values in brackets are standard deviations. Based on previous AFLP data obtained in the same laboratory and derived from identical experimental conditions (Ah-You *et al.*, 2009), EGD values of 0.062 and 0.073 nsps obtained between the pathotype strain of pv. *mangiferaeindicae* (CFBP 1716) and two strains of pv. *anacardii* (LA98 and CFBP 2913) corresponded to ΔT_m values of 2.0 and 2.5 °C, respectively. Values in bold indicate cases for which synonymy among species is likely.

[‡] Genetic clusters as defined by Rademaker *et al.* (2000).

Table 2. Sequence variations for four housekeeping genes.

Gene	<i>gyrB</i>	<i>dnaK</i>	<i>efp</i>	<i>atpD</i>
Function	DNA gyrase subunit β	70-KDa Heat Shock Protein (Hsp70)	Elongation factor P	F1-F0-ATPase β subunit
Length (bp)	774	765	387	768
C+G %	63.1	63.4	64.5	64.5
Ts/Tv [*]	2.8845 (0.5403)	2.8262 (0.7911)	1.4316 (0.4674)	1.6068 (0.3758)
Mean nucleotide identity	0.931	0.956	0.945	0.949
Ka [†]	0.01913 (0.0028)	0.0073 (0.0016)	0.0246 (0.0049)	0.0166 (0.0035)
Ks [†]	0.2916 (0.0218)	0.1872 (0.0176)	0.1956 (0.0264)	0.1786 (0.0151)
No of alleles	78	79	61	72
No of polymorphic sites	326	231	122	241
Nucleotidic diversity per site	0.0715	0.0445	0.0560	0.0519
Tajima's D	-1.3869 [‡]	-1.4503 [‡]	-1.1902 [‡]	-1.3489 [‡]

^{*} Transition and transversion ratio determined using Kimura's 2-parameter method (Kimura, 1980). Values in brackets are standard deviations.

[†] Synonymous and non-synonymous substitution rate determined using the Nei & Gojobori method (Nei & Gojobori, 1986). Values in brackets are standard deviations.

[‡] Not significant ($P > 0.10$).

Table 3. Information on the putative recombination events detected for four housekeeping genes for *Xanthomonas* species classified in the 16S rRNA gene *X. campestris* core.

			Recombination detected for the following dataset		Closest species	
			Putative			
Gene	Species (Sequence type)	Estimated position	All strains	<i>X. campestris</i> core strains	recombinant region	Outside
<i>atpD</i>	<i>X. euvesicatoria</i> (ST E1)	Undetermined [*]	Yes (3/7) [†]	Yes (4/7)	<i>X. melonis</i>	<i>X. axonopodis</i> 9.2 <i>X. perforans</i> <i>X. alfae</i>
<i>atpD</i>	<i>X. oryzae</i>	289-531 (289-531) [‡]	Yes (3/7)	Yes (3/7)	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i>	<i>X. axonopodis</i> 9.2 <i>X. citri</i>
<i>atpD</i>	<i>X. arboricola</i>	Undetermined [*]	No	Yes (4/7)	<i>X. pisi</i>	<i>X. vasicola</i>
<i>dnaK</i>	<i>X. codiae</i>	185-709 (155-772)	Yes (3/7)	Yes (5/7)	<i>X. axonopodis</i> 9.2	<i>X. cassavae</i>
<i>dnaK</i>	<i>X. oryzae</i>	(196-565)	No	Yes (3/7)	<i>X. axonopodis</i> 9.4	<i>X. vasicola</i>
<i>dnaK</i>	<i>X. cucurbitae</i>	(303-424)	No	Yes (4/7)	<i>X. vesicatoria</i>	<i>X. cassavae</i>
<i>gyrB</i>	<i>X. arboricola</i>	Undetermined	Yes (3/7)	No	<i>X. citri</i>	<i>X. pisi</i>

* The putative recombination region included the beginning/end of the analyzed gene portion or matched its entire length and may likely be larger than the determined size.

[†] Number of significant ($P = 0.05$) recombination detection algorithms out of the seven ones tested by the RDP3 software.

[‡] Nucleotide positions of recombination breakpoints (numbers are based on the gene sequences from the genome of *X. euvesicatoria* strain 85-10 (Thieme *et al.*, 2005)) for the dataset containing all valid *Xanthomonas* species. Values in brackets are for the dataset only containing species of the *X. campestris* 16S rRNA gene core.

Table 4. Results of the Shimodaira-Hasegawa test of alternative ML tree topologies for the genes used for MLSA.

Tree topology	Likelihood scores (-ln L) for the following data sets [*]				
	<i>atpD</i>	<i>dnaK</i>	<i>efp</i>	<i>gyrB</i>	Concatenated
<i>atpD</i>	3860	5866***	2602***	8085***	20399***
<i>dnaK</i>	5472***	3849	2591***	7133***	19034***
<i>efp</i>	6256***	6492***	1947	8901***	23585***
<i>gyrB</i>	5835***	5249***	2695***	5093	18860***
Concatenated	4325*	4173	2189*	5428	16103

* *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. The lowest (best) likelihood scores are indicated by boldface type.

Table 5. Examples of pathogenicity and population sizes recorded from leaf lesions 25 days after the inoculation of three host species for *Xanthomonas cynarae* and *X. gardneri*.

	Tomato cv. marmande			Pepper cv. yolo wonder			Pepper cv. aiguille			Artichoke cv. violet de Provence			
		dai [*]	population size [†]	dai [*]	population size [†]	dai [*]	population size [†]	dai [*]	population size [†]	dai [*]	population size [†]		
<i>X. cynarae</i>	CFBP 4188	4-7	6.49 (0.48)	c	3-4	6.96 (0.55)	c	5	6.95 (0.41)	c	6-9	7.49 (0.64)	ab
	CFBP 4182	4-7	6.57 (0.51)	c	4-5	6.75 (0.46)	c	5	6.90 (0.36)	c	6-9	7.32 (0.44)	bc
	CFBP 4209	4-7	6.33 (0.44)	c	4-5	6.84 (0.43)	c	5	6.95 (0.64)	c	6-7	7.14 (0.59)	abc
<i>X. gardneri</i>	NCPBP 881	3-4	7.04 (0.28)	b	4	7.71 (0.54)	b	5	7.54 (0.47)	b	5-7	7.13 (0.44)	c
	ICMP 1620	4	7.14 (0.16)	b	3-4	8.30 (0.34)	a	5	7.83 (0.40)	a	5-11	6.97 (0.48)	c
	ICMP 7383	4	7.67 (0.36)	a	3-4	7.62 (0.69)	b	5-6	6.19 (0.34)	d	6-11	7.49 (0.35)	a

* Number of days after inoculation for initial observation of lesions.

[†] Each value represents log-transformed cfu lesion⁻¹. Standard deviation is given in brackets. Data from two separate experiments are provided. Strain comparisons were based on Wilcoxon-Mann-Whitney tests. Population size values with the same letter(s) did not differ significantly (P =0.05).

Fig. 1. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (Mougel *et al.*, 2002) showing the relationships between *Xanthomonas* species and xanthomonads responsible for bacterial spot of tomato and pepper (shown in bold characters) based on AFLP data. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates type strains.

Fig. 2. Neighbornet network (Huson & Bryant, 2006) showing the relationships among species of the *Xanthomonas campestris* core *sensu* Hauben *et al.* (1997) based on *atpD* sequence data (least square fit = 99.60).

Fig. 3. Neighbornet network (Huson & Bryant, 2006) showing the relationships among species of the *Xanthomonas campestris* core *sensu* Hauben *et al.* (1997) based on *dnaK* sequence data (least square fit = 99.61).

Fig. 4. Neighbornet network (Huson & Bryant, 2006) showing the relationships among species of the *Xanthomonas campestris* core *sensu* Hauben *et al.* (1997) based on *efp* sequence data (least square fit = 99.49).

Fig. 5. Neighbornet network (Huson & Bryant, 2006) showing the relationships among species of the *Xanthomonas campestris* core *sensu* Hauben *et al.* (1997) based on *gyrB* sequence data (least square fit = 99.79).

Fig. 1

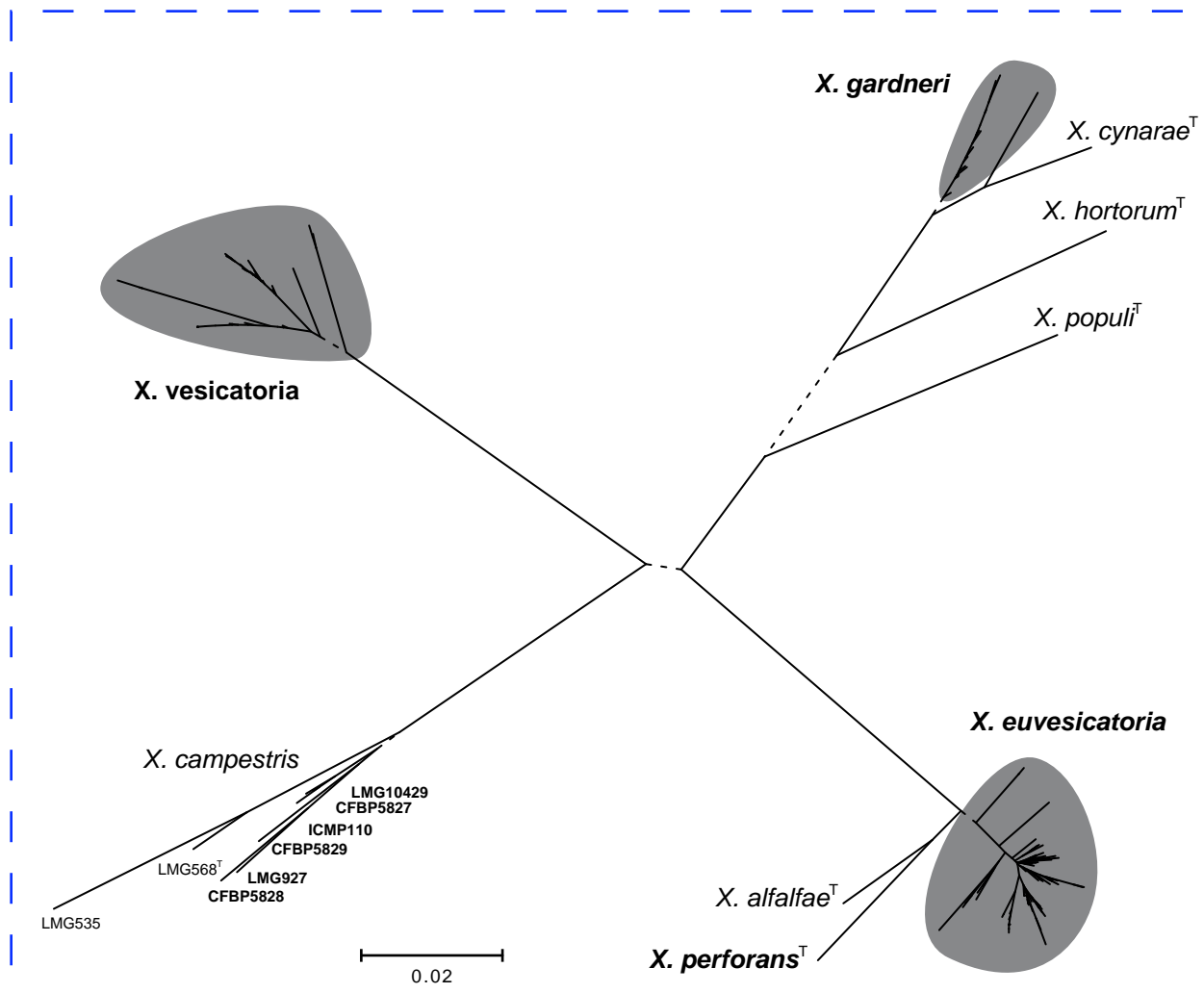


Fig. 2

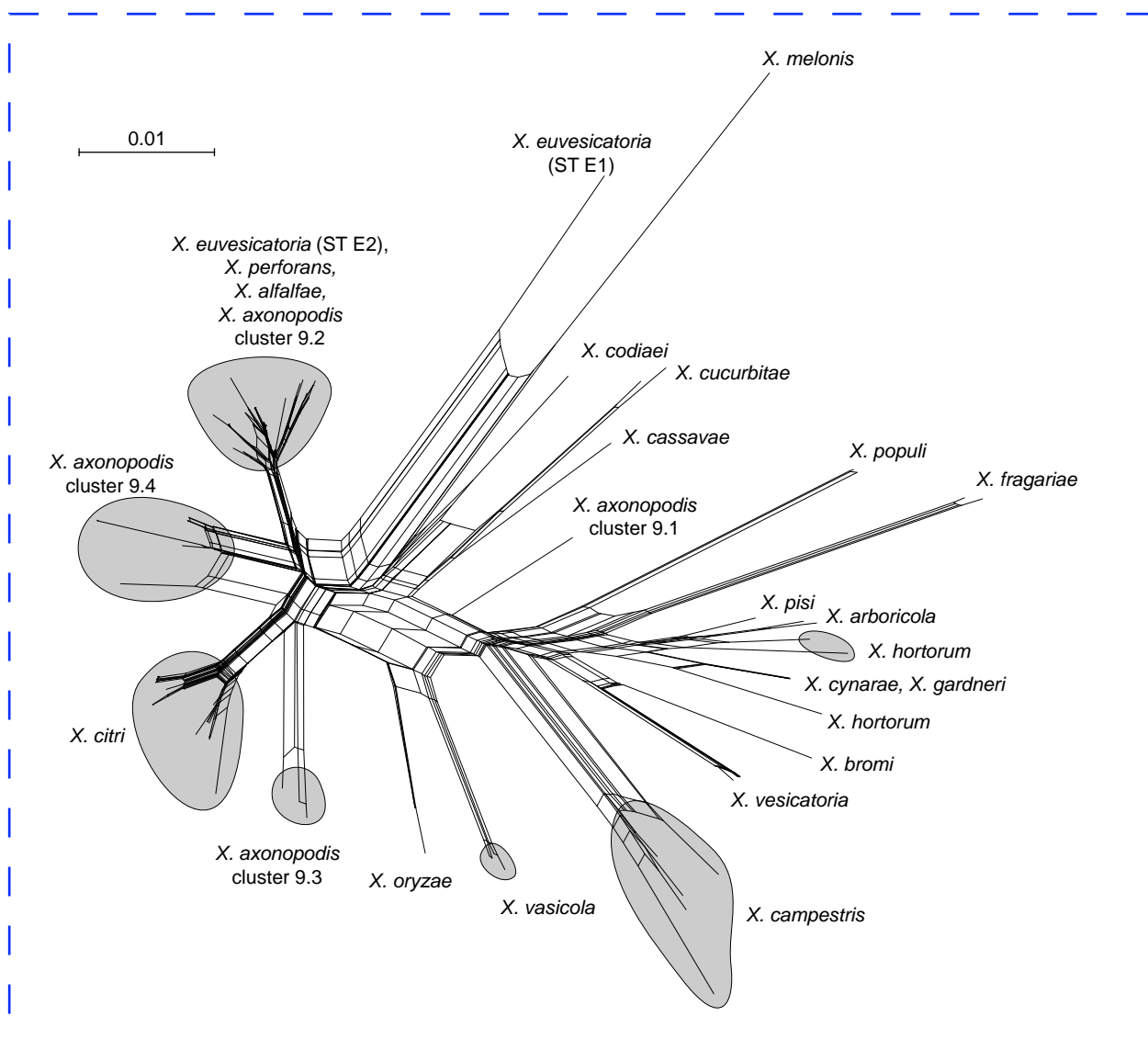


Fig. 3

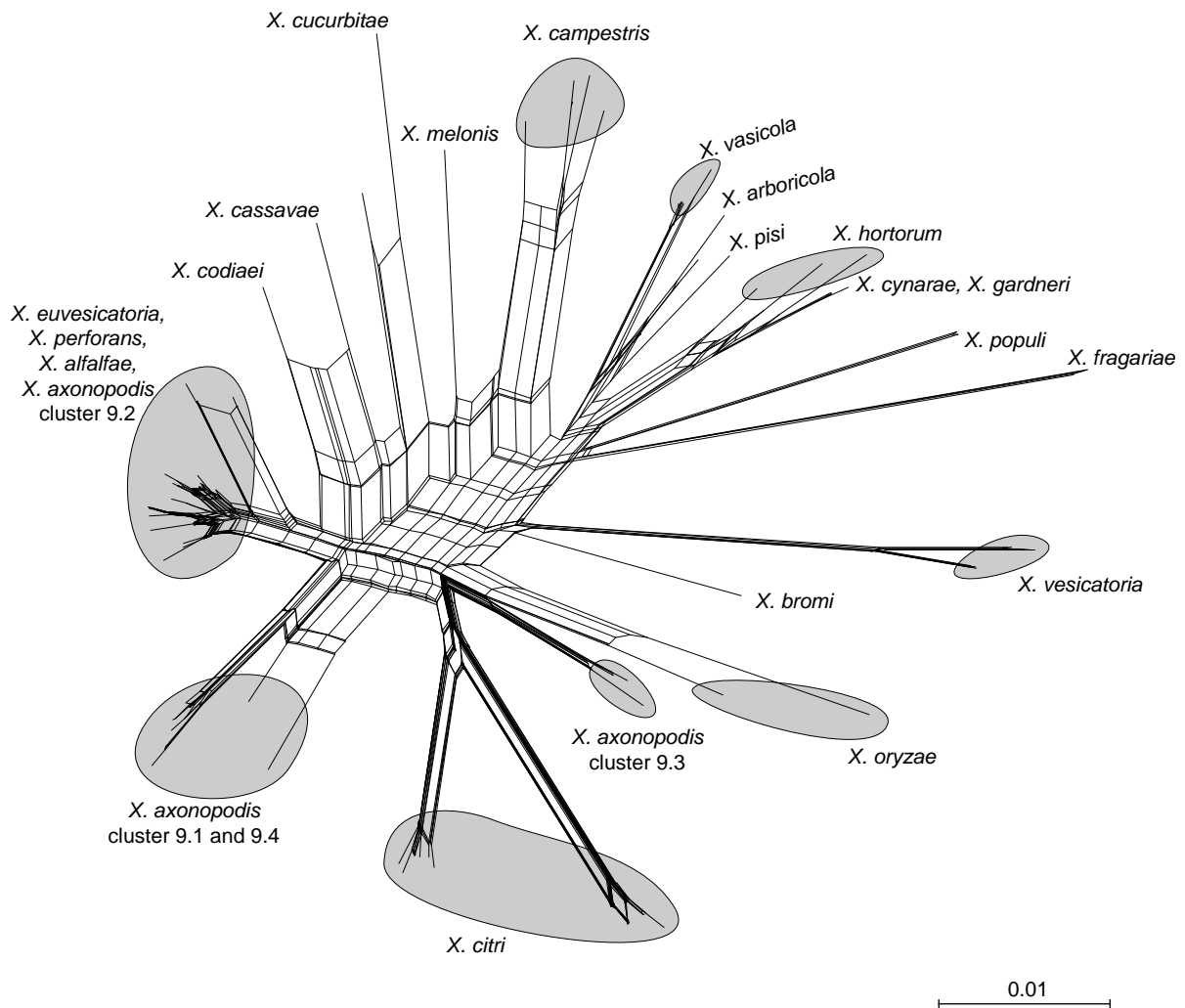


Fig. 4

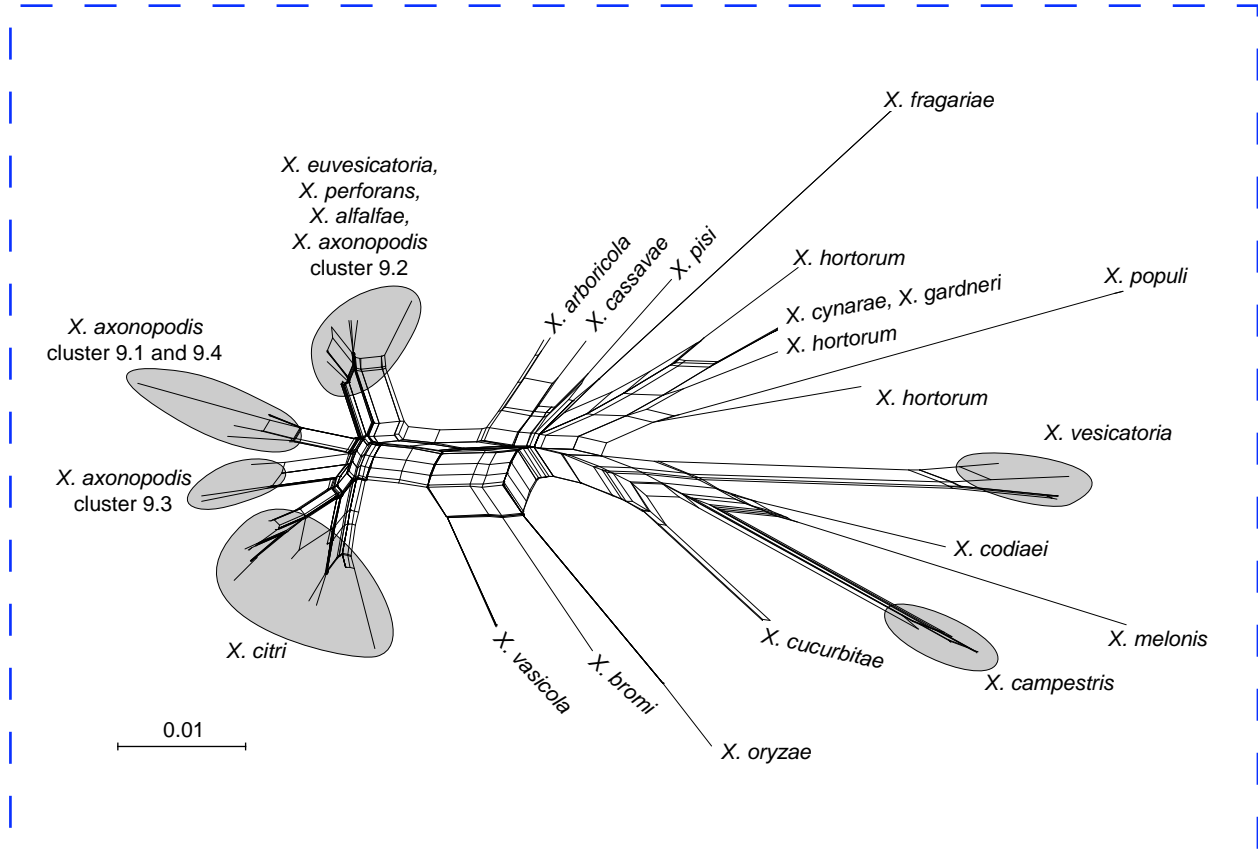
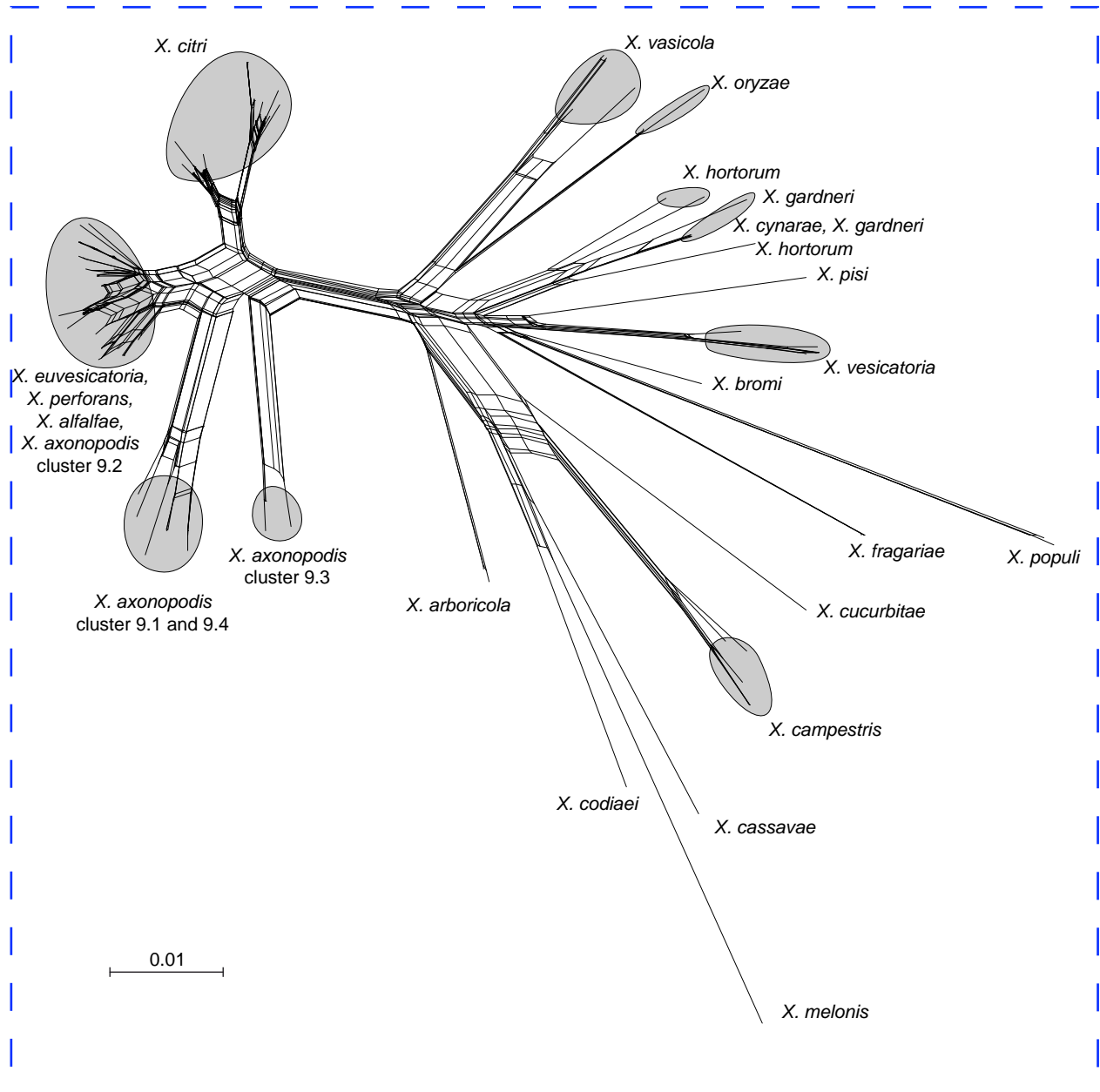


Fig. 5



Supplementary Table 1. *Xanthomonas* strains used for AFLP and MLSA.

Strain	Current species name	Current pathovar name	Host of isolation	Country of isolation	Genetic cluster [*]	Typing techniques	Sequence type (BSTP-causing strains)
LMG 494 [*]	<i>X. albilineans</i>	NA	<i>Saccharum officinarum</i>	Fiji	NA	AFLP/MLSA	NA
ICMP 10040	<i>X. albilineans</i>	NA	<i>Saccharum officinarum</i>	French West Indies	NA	MLSA	NA
NCPBP 2503	<i>X. albilineans</i>	NA	<i>Saccharum officinarum</i>	French West Indies	NA	MLSA	NA
LMG 495 ^{**†}	<i>X. alfalfae</i>	<i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>	India	9.2	AFLP/MLSA	NA
LMG 8019	<i>X. alfalfae</i>	<i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>	Japan	9.2	MLSA	NA
LMG 497	<i>X. alfalfae</i>	<i>alfalfae</i>	<i>Medicago sativa</i>	Sudan	9.2	MLSA	NA
CFBP 2910	<i>X. alfalfae</i>	<i>citrumelo</i>	<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>	USA	9.2	MLSA	NA
CFBP 3138	<i>X. alfalfae</i>	<i>citrumelo</i>	<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>	USA	9.2	MLSA	NA
CFBP 3371	<i>X. alfalfae</i>	<i>citrumelo</i>	<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>	USA	9.2	MLSA	NA
JJ238-28	<i>X. alfalfae</i>	<i>citrumelo</i>	<i>Poncirus trifoliata</i> x <i>Citrus paradisi</i>	USA	9.2	MLSA	NA
LMG 747 [*]	<i>X. arboricola</i>	<i>juglandis</i>	<i>Juglans regia</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 852	<i>X. arboricola</i>	<i>pruni</i>	<i>Prunus salicina</i>	New Zealand	NA	MLSA	NA
CFBP 6367	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	<i>Allium cepa</i>	Barbados	9.2	MLSA	NA
CFBP 6107	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	<i>Allium fistulosum</i>	Japan	9.2	MLSA	NA

CFBP 6369	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	<i>Allium cepa</i>	Réunion	9.2	MLSA	NA
JW202	<i>X. axonopodis</i>	<i>allii</i>	<i>Allium cepa</i>	USA	9.2	MLSA	NA
LMG 539	<i>X. axonopodis</i>	<i>axonopodis</i>	<i>Axonopus scoparius</i>	Colombia	9.3	MLSA	NA
LMG 982 *	<i>X. axonopodis</i>	<i>axonopodis</i>	<i>Axonopus scoparius</i>	Colombia	9.3	AFLP/MLSA	NA
LMG 7596	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	Belgium	9.1	MLSA	NA
LMG 7303	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	New Zealand	9.1	MLSA	NA
LMG 551	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	United Kingdom	9.1	MLSA	NA
LMG 7188	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	United Kingdom	9.1	MLSA	NA
LMG 7189	<i>X. axonopodis</i>	<i>begoniae</i>	<i>Begonia</i> sp.	USA	9.1	MLSA	NA
LMG 8048	<i>X. axonopodis</i>	<i>cassavae</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Niger	9.2	MLSA	NA
LMG 675	<i>X. axonopodis</i>	<i>cassiae</i>	<i>Cassia tora</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 686	<i>X. axonopodis</i>	<i>coracanae</i>	<i>Eleusine coracana</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 691	<i>X. axonopodis</i>	<i>cyamopsidis</i>	<i>Cyamopsis tetragonolobus</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 692	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodii</i>	<i>Desmodium dichotomum</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 693	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodiigangetici</i>	<i>Desmodium gangeticum</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 694	<i>X. axonopodis</i>	<i>desmodiitundifolii</i>	<i>Desmodium styracifolium</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 695	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	<i>Anthurium</i> sp.	Brazil	9.4	MLSA	NA

LMG 12737	<i>X. axonopodis</i>	<i>dieffenbachiae</i>	<i>Anthurium</i> sp.	French West Indies	9.4	MLSA	NA
LMG 698	<i>X. axonopodis</i>	<i>erythrinae</i>	<i>Erythrina variegata</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 757	<i>X. axonopodis</i>	<i>lespedezae</i>	<i>Lespedeza</i> sp.	USA	9.2	MLSA	NA
CFBP 1857	<i>X. axonopodis</i>	<i>manihotis</i>	<i>Manihot esculenta</i>	Nigeria	9.4	MLSA	NA
LMG 811	<i>X. axonopodis</i>	<i>patelii</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 7455	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	USA	9.4	MLSA	NA
LMG 8014	<i>X. axonopodis</i>	<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Romania	9.4	MLSA	NA
LMG 844	<i>X. axonopodis</i>	<i>phyllanthi</i>	<i>Phyllanthus niruri</i>	Sudan	9.2	MLSA	NA
LMG 849	<i>X. axonopodis</i>	<i>poinsetticola</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 861	<i>X. axonopodis</i>	<i>ricini</i>	<i>Ricinus communis</i>	Ethiopia	9.2	MLSA	NA
CFBP 2623	<i>X. axonopodis</i>	<i>spondiae</i>	<i>Spondia cythera</i>	France	NA	MLSA	NA
CFBP 2547	<i>X. axonopodis</i>	<i>spondiae</i>	<i>Spondia dulcis</i>	French West Indies	NA	MLSA	NA
LMG 9055	<i>X. axonopodis</i>	<i>sygonii</i>	<i>Sygonium podophyllum</i>	USA	9.4	MLSA	NA
LMG 955	<i>X. axonopodis</i>	<i>tamarindi</i>	<i>Tamarindus indica</i>	India	9.2	MLSA	NA
LMG 895	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Australia	9.3	MLSA	NA
LMG 899	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Thysanolaena maxima</i>	Mauritius	9.3	MLSA	NA
LMG 901	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Mauritius	9.3	MLSA	NA

LMG 8715	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Réunion	9.3	MLSA	NA
LMG 8716	<i>X. axonopodis</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Réunion	9.3	MLSA	NA
LMG 947 *	<i>X. bromi</i>	NA	<i>Bromus carinatus</i>	France	NA	MLSA	NA
LMG 8267	<i>X. bromi</i>	NA	<i>Bromus willdenowii</i>	New Zealand	NA	MLSA	NA
ICMP 110 [†]	<i>X. campestris</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	MLSA	R1
LMG 10429 [†]	<i>X. campestris</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	MLSA	R1
LMG 927 [†]	<i>X. campestris</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Zambia	NA	AFLP/MLSA	R2
LMG 535	<i>X. campestris</i>	<i>armoraciae</i>	<i>Iberis</i> sp.	Tanzania	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 568 *	<i>X. campestris</i>	<i>campestris</i>	<i>Brassica oleracea</i>	United Kingdom	NA	AFLP/MLSA	NA
CFBP 5827 [†]	<i>X. campestris</i>	<i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	R1
CFBP 5828 [†]	<i>X. campestris</i>	<i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	R2
CFBP 5829 [†]	<i>X. campestris</i>	<i>raphani</i>	<i>Raphanus sativus</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	R3
LMG 673 *	<i>X. cassavae</i>	NA	<i>Manihot esculenta</i>	Malawi	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 5267	<i>X. cassavae</i>	NA	<i>Manihot esculenta</i>	Rwanda	NA	AFLP/MLSA	NA
CFBP 2913	<i>X. citri</i>	<i>anacardii</i>	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	9.6	AFLP/MLSA	NA
LA100	<i>X. citri</i>	<i>anacardii</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Brazil	9.6	MLSA	NA
CFBP 2868	<i>X. citri</i>	<i>aurantifolii</i>	<i>Citrus limon</i>	Argentina	9.6	MLSA	NA

CFBP 2901	<i>X. citri</i>	<i>aurantifolii</i>	<i>Citrus limon</i>	Argentina	9.6	MLSA	NA
CFBP 2866	<i>X. citri</i>	<i>aurantifolii</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	Brazil	9.6	MLSA	NA
LMG 548	<i>X. citri</i>	<i>bauliniae</i>	<i>Bauhinia racemosa</i>	India	9.5	MLSA	NA
NCPPB 1759	<i>X. citri</i>	<i>bilvae</i>	<i>Feroniae elephantacum</i>	India	9.5	MLSA	NA
NCPPB 3213	<i>X. citri</i>	<i>bilvae</i>	<i>Aegle marmelos</i>	India	9.5	MLSA	NA
LMG 558	<i>X. citri</i>	<i>cajani</i>	<i>Cajanus cajan</i>	India	9.5	MLSA	NA
ICMP 9000	<i>X. citri</i>	<i>cajani</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Fiji	9.5	MLSA	NA
IAPAR 306	<i>X. citri</i>	<i>citri</i>	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	9.5	MLSA	NA
NCPPB 3562	<i>X. citri</i>	<i>citri</i>	<i>Citrus limon</i>	India	9.5	MLSA	NA
CFBP 2525	<i>X. citri</i>	<i>citri</i>	<i>Citrus limon</i>	New Zealand	9.5	MLSA	NA
CFBP 2911	<i>X. citri</i>	<i>citri</i>	<i>Citrus</i> sp.	Pakistan	9.5	MLSA	NA
LMG 9322 *	<i>X. citri</i>	<i>citri</i>	<i>Citrus aurantifolia</i>	USA	9.5	MLSA	NA
LMG 9045	<i>X. citri</i>	<i>clitoriae</i>	<i>Clitoria biflora</i>	India	9.5	MLSA	NA
LMG 9046	<i>X. citri</i>	<i>desmodiilaxiflora</i>	<i>Desmodium laxiflorum</i>	India	9.5	AFLP/MLSA	NA
LMG 532	<i>X. citri</i>	<i>dieffenbachiae</i>	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>	French West Indies	9.6	MLSA	NA
LMG 7399	<i>X. citri</i>	<i>dieffenbachiae</i>	<i>Dieffenbachia</i> sp.	USA	9.6	MLSA	NA
LMG 712	<i>X. citri</i>	<i>glycines</i>	<i>Glycine max</i>	Sudan	9.5	MLSA	NA

LMG 8026	<i>X. citri</i>	<i>glycines</i>	<i>Glycine javanica</i>	Zambia	9.5	MLSA	NA
LMG 760	<i>X. citri</i>	<i>malvacearum</i>	<i>Gossypium</i> sp.	India	9.5	MLSA	NA
LMG 761	<i>X. citri</i>	<i>malvacearum</i>	<i>Gossypium</i> sp.	Sudan	9.5	MLSA	NA
CFBP 1716	<i>X. citri</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	<i>Mangifera indica</i>	India	9.5	MLSA	NA
CFBP 2939	<i>X. citri</i>	<i>mangiferaeindicae</i>	<i>Schinus terebenthifolius</i>	Réunion	9.5	MLSA	NA
LMG 826	<i>X. citri</i>	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Canada	9.6	AFLP/MLSA	NA
LMG 837	<i>X. citri</i>	<i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	South Africa	9.6	MLSA	NA
LMG 8021	<i>X. citri</i>	<i>rhynchosiae</i>	<i>Rhynchosia memnonia</i>	Sudan	9.6	MLSA	NA
LMG 867	<i>X. citri</i>	<i>sesbaniae</i>	<i>Sesbania sesban</i>	NA	9.6	MLSA	NA
LMG 936	<i>X. citri</i>	<i>vignaeradiatae</i>	<i>Vigna radiata</i>	Sudan	9.6	MLSA	NA
LMG 8139	<i>X. citri</i>	<i>vignicola</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	India	9.6	MLSA	NA
LMG 828	<i>X. citri</i>	<i>vignicola</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Sudan	9.6	MLSA	NA
LMG 8677	<i>X. codiaei</i>	NA	<i>Codiaeum variegatum</i>	USA	NA	MLSA	NA
LMG 8678 *	<i>X. codiaei</i>	NA	<i>Codiaeum variegatum</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 8663	<i>X. cucurbitae</i>	NA	<i>Cucurbita maxima</i>	Australia	NA	MLSA	NA
LMG 690 *	<i>X. cucurbitae</i>	NA	<i>Cucurbita maxima</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	NA
CFBP 4182 [†]	<i>X. cynarae</i>	NA	<i>Cynara scolymus</i>	France	NA	MLSA	C1

CFBP 4188 ^{*†}	<i>X. cynarae</i>	NA	<i>Cynara scolymus</i>	France	NA	AFLP/MLSA	C1
CFBP 4209 [†]	<i>X. cynarae</i>	NA	<i>Cynara scolymus</i>	France	NA	MLSA	C1
CFBP 6805	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	Argentina	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 8037	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Brazil	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 8038	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Brazil	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 932	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	Brazil	9.2	AFLP	ND
LMG 933	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	Brazil	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 6057	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Cook Islands	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 6063	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Cook Islands	9.2	AFLP	ND
ICMP 7183	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Cook Islands	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 668	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Cook Islands	9.2	AFLP	ND
ICMP 7393	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Fiji	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 1604	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 2484	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3268	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 3269	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 3270	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND

CFBP 3271	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3272	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3273	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3274	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3275	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 3276	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 3278	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5594	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5596	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5597	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 5599	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5600	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5604	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 5608	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5609	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 5612	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP	ND
CFBP 5613	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	French West Indies	9.2	AFLP/MLSA	E1

LD50	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Grenada	9.2	AFLP/MLSA	E2
LD52	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Grenada	9.2	AFLP	ND
LD53	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Grenada	9.2	AFLP/MLSA	E2
LD54	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Grenada	9.2	AFLP/MLSA	E1
LD55	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Grenada	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 171	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Hungary	9.2	AFLP	ND
ICMP 9085	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Hungary	9.2	AFLP	ND
ICMP 9086	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Hungary	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 9087	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Hungary	9.2	AFLP	ND
LMG 926	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	Hungary	9.2	AFLP/MLSA	E1
NCPPB 3312	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	Hungary	9.2	AFLP	ND
NCPPB 3314	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	Hungary	9.2	AFLP	ND
ICMP 3381	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	India	9.2	AFLP/MLSA	E2
LMG 905	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	India	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 906	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	India	9.2	AFLP	ND
LMG 907	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	India	9.2	AFLP/MLSA	E2
LMG 908	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	India	9.2	AFLP/MLSA	E2

LMG 918	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	India	9.2	AFLP/MLSA	E2
ICMP 7710	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Ivory coast	9.2	AFLP	ND
LMG 909	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum</i> sp.	Ivory coast	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 910	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Morocco	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 667	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	NA	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 5051	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 7708	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	New Zealand	9.2	AFLP/MLSA	E1
NCPBP 1227	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Puerto Rico	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 913	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum</i> sp.	Senegal	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 914	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Senegal	9.2	AFLP/MLSA	E1
NCPBP 3178	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Senegal	9.2	AFLP	ND
CFBP 6806	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	Spain	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 6817	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	NA	Thailand	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 4776	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Tonga	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 4779	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	Tonga	9.2	AFLP/MLSA	E1
CFBP 5618	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 105	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND

ICMP 175	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 176	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 178	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 179	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 180	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 181	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 182	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 183	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 184	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
ICMP 185	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 1643	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum annuum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
ICMP 1644	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 921	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	9.2	AFLP	ND
LMG 922	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 928	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	9.2	AFLP	ND
LMG 929	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
LMG 930	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	9.2	AFLP	ND

NCPBP 2576	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP	ND
NCPBP 2968 ^{wt}	<i>X. euvesicatoria</i>	NA	<i>Capsicum frutescens</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	E1
LMG 705	<i>X. fragariae</i>	NA	<i>Fragaria ananassa</i>	Australia	NA	MLSA	NA
LMG 710	<i>X. fragariae</i>	NA	<i>Fragaria vesca</i>	Italy	NA	MLSA	NA
LMG 704	<i>X. fragariae</i>	NA	<i>Fragaria ananassa</i>	New Zealand	NA	MLSA	NA
CFBP 2510	<i>X. fragariae</i>	NA	<i>Fragaria</i> sp.	Spain	NA	MLSA	NA
LMG 708 [*]	<i>X. fragariae</i>	NA	<i>Fragaria ananassa</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	NA
CFBP 6822	<i>X. gardneri</i>	NA	NA	Argentina	NA	AFLP/MLSA	G1
IBSBF 1782	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	G1
IBSBF 1783	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	G1
LD56	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD57	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD58	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD59	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP/MLSA	G1
LD60	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD61	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD62	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND

LD64	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD65	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD66	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD67	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP/MLSA	G1
LD68	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD69	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
LD70	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Canada	NA	AFLP	ND
ICMP 111	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 117	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 119	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 121	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 122	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 7383 [†]	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	G2
IBSBF 2373	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	NA	AFLP/MLSA	G1
ICMP 1620 [†]	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	NA	AFLP/MLSA	G1
NCPBP 881 ^{**†}	<i>X. gardneri</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Yugoslavia	NA	AFLP/MLSA	G1
LMG 8643	<i>X. hortorum</i>	<i>carotae</i>	<i>Daucus carota</i>	Canada	NA	MLSA	NA

LMG 8644	<i>X. hortorum</i>	<i>carotae</i>	<i>Daucus carota</i>	USA	NA	MLSA	NA
LMG 733 *	<i>X. hortorum</i>	<i>hederae</i>	<i>Hedera helix</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 7314	<i>X. hortorum</i>	<i>pelargonii</i>	<i>Pelargonium peltatum</i>	New Zealand	NA	MLSA	NA
LMG 739 *	<i>X. hyacinthi</i>	NA	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Netherlands	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 8041	<i>X. hyacinthi</i>	NA	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Netherlands	NA	MLSA	NA
CFBP 5855	<i>X. melonis</i>	NA	<i>Cucumis melo</i>	Brazil	NA	MLSA	NA
LMG 8670 *	<i>X. melonis</i>	NA	<i>Cucumis melo</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 8673	<i>X. melonis</i>	NA	<i>Cucumis melo</i>	Brazil	NA	MLSA	NA
LMG 5047 *	<i>X. oryzae</i>	<i>oryzae</i>	<i>Oryza sativa</i>	India	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 797	<i>X. oryzae</i>	<i>oryzicola</i>	<i>Oryza sativa</i>	Malaysia	NA	MLSA	NA
NCPBP 4321 *†	<i>X. perforans</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	9.2	AFLP/MLSA	P1
LMG 847 *	<i>X. pisi</i>	NA	<i>Pisum sativum</i>	Japan	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 5745	<i>X. populi</i>	NA	<i>Populus</i> sp.	Belgium	NA	MLSA	NA
LMG 5743 *	<i>X. populi</i>	NA	<i>Populus canadensis</i>	France	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 471 *	<i>X. sacchari</i>	NA	<i>Saccharum officinarum</i>	French West Indies	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 472	<i>X. sacchari</i>	NA	<i>Saccharum officinarum</i>	French West Indies	NA	MLSA	NA
LMG 8684 *	<i>X. theicola</i>	NA	<i>Camellia sinensis</i>	Japan	NA	AFLP/MLSA	NA

LMG 8685	<i>X. theicola</i>	NA	<i>Camellia sinensis</i>	Japan	NA	MLSA	NA
LMG 876 *	<i>X. translucens</i>	<i>translucens</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 892	<i>X. translucens</i>	<i>undulosa</i>	<i>Triticum turgidum</i>	Canada	NA	MLSA	NA
LMG 736 *	<i>X. vasicola</i>	<i>holcicola</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	NA
LMG 7416	<i>X. vasicola</i>	<i>holcicola</i>	<i>Holcus</i> sp.	USA	NA	MLSA	NA
LMG 8719	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Kenya	NA	MLSA	NA
LMG 900	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Madagascar	NA	MLSA	NA
LMG 8284	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Zea mays</i>	South Africa	NA	MLSA	NA
LMG 8744	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	South Africa	NA	MLSA	NA
LMG 8717	<i>X. vasicola</i>	<i>vasculorum</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Zimbabwe	NA	MLSA	NA
CFBP 6823	<i>X. vesicatoria</i>	NA	NA	Argentina	NA	AFLP	ND
ICMP 8035	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	V4
ICMP 8036	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	V4
LMG 934	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brazil	NA	AFLP/MLSA	V4
CFBP 30	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	France	NA	AFLP	ND
CFBP 1545	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	France	NA	AFLP/MLSA	V2
ICMP 113	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	V4

ICMP 115	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
ICMP 118	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
ICMP 120	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
ICMP 174	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
ICMP 9083	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
ICMP 9084	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
LMG 923	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	V1
LMG 924	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
LMG 925	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP	ND
NCPBP 1421	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Hungary	NA	AFLP/MLSA	V5
NCPBP 3315	<i>X. vesicatoria</i>	NA	NA	Hungary	NA	AFLP	ND
LMG 915	<i>X. vesicatoria</i>	NA	NA	Israel	NA	AFLP/MLSA	V1
LMG 920	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Italy	NA	AFLP/MLSA	V1
NCPBP 3311	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Italy	NA	AFLP/MLSA	V2
NCPBP 1332	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Jamaica	NA	AFLP/MLSA	V5
CFBP 4645	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP	ND
ICMP 64	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP	ND

ICMP 99	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP	ND
ICMP 100	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	V5
ICMP 638	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	V1
ICMP 696	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP	ND
LMG 911 ^{*†}	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	V1
LMG 916	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP	ND
LMG 917	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	New Zealand	NA	AFLP/MLSA	V1
CFBP 1941	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Spain	NA	AFLP	ND
NCPPB 3240	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Spain	NA	AFLP/MLSA	V4
ICMP 96	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	AFLP	ND
ICMP 103	<i>X. vesicatoria</i>	NA	NA	USA	NA	AFLP/MLSA	V3
ICMP 104	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	V1
ICMP 107	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	AFLP/MLSA	V1
ICMP 108	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	USA	NA	AFLP	ND
LMG 919	<i>X. vesicatoria</i>	NA	<i>Solanum lycopersicum</i>	Zimbabwe	NA	AFLP/MLSA	V4

NA: not appropriate.

^{*} Type strain.

[†] Strains used for pathogenicity assays.

Supplementary Table 2. AFLP primers and adaptors used in this study

Ligation adaptors	sequence 5' > 3'
<i>Msp</i> I adaptor A1MSP	GACGATGAGTCCTGAG
A2MSP	CGCTCAGGACTCATC
<i>Sac</i> I adaptor A1SAC	CTCGTAGACTGCGTACAAGCT
A2SAC	TGTACGCAGTCTACG
Preamplification primers	sequence 5' > 3'
<i>Msp</i> I primer	GATGAGTCCTGAGCGG
<i>Sac</i> I primer	TAGACTGCGTACAAGCTC
Selective amplification <i>Msp</i>I primers	sequence 5' > 3'
	GATGAGTCCTGAGCGGA
	GATGAGTCCTGAGCGGC
	GATGAGTCCTGAGCGGT
	GATGAGTCCTGAGCGGG
Labeled selective amplification <i>Sac</i>I primers	sequence 5' > 3'
	6-FAM [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	VIC [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	NED [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC
	PET [™] - TAGACTGCGTACAAGCTCC

Supplementary Table 3. Amplification and sequencing primers used in the MLSA scheme

Gene	Amplification primers (5' > 3')		Sequencing primers (5' > 3')	
<i>atpD</i> ¹	GGGCAAGATCGTTCAGAT	9-26 ²	GGGCAAGATCGTTCAGAT	9-26
	GCTCTTGGTCGAGGTGAT	859-876	GCTCTTGGTCGAGGTGAT	859-876
<i>dnaK</i>	TGGGCAAGATCATTGGTATT	2-21	TGGGCAAGATCATTGGTATT	2-21
	ACCTTCGGCATAACGGGTCTG	1030-1049	GCATCGGCGGTGACGTAC	855-872
<i>dnak</i>	TGGGCAAGATCATCGGCATC	2-21	TGGGCAAGATCATCGGCATC	2-21
	CTTGGGCATGCGGGTCTG	1032-1049	GCGTCGGCGGTGACGTAA	855-872
<i>efp</i>	TCATCACCGAGACCGAAT	68-85	TCATCACCGAGACCGAAT	68-85
	TCCTGGTTGACGAACAG	496-512	TCCTGGTTGACGAACAG	496-512
<i>efp</i>	GTCAAGAACGGCATGAAGA	25-43	GTCAAGAACGGCATGAAGA	25-43
	TCGTCCTGGTTGACGAAC	500-517	TCGTCCTGGTTGACGAAC	500-517
<i>efp</i>	ACGATGTCAAGAACGGGATG	20-39	ACGATGTCAAGAACGGGATG	20-39
	GAACAAGGGCACCCGCACCA	482-501	GAACAAGGGCACCCGCACCA	482-501
<i>gyrB</i>	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	301-320	GCCGAGGTGATCCTCACCGT	301-320
	GGCCGAGCCACCTGCCGAGT	1307-1326	ATGGCCTTGGCTTCGTTC	1051-1069
<i>gyrB</i>	GCCGAAGTCGTGATGACCGT	301-320	GCCGAAGTCGTGATGACCGT	301-320
	CGAGCCGCCCGCTGAATC	1307-1324	ATGGCCTTGGCCTCGTTG	1125-1142

¹ Gene names in bold indicate primers that were used for producing amplicons for all or most *Xanthomonas* species. Other primers were used as alternatives in case of amplification problems.

² Primers complement indicated base numbers. Numbers are derived from the gene sequences of *Xanthomonas citri* pv. *citri* strain 306 (Da Silva *et al.*, 2002).

Supplementary Table 4. Genetic distances between *Xanthomonas alfalfae*, *X. euvesicatoria* and *X. perforans* derived from sequence data obtained for four gene portions.

Species	Gene portion	Species			
		<i>X. alfalfae</i> ^{T*}	<i>X. euvesicatoria</i> ^T (ST E1)	<i>X. euvesicatoria</i> (ST E2)	<i>X. perforans</i> ^T
<i>X. alfalfae</i> ^T	<i>atpD</i>	0.0000 [†]	<i>0.0498</i>	0.0122	0.0108
	<i>dnaK</i>	0.0000	0.0119	0.0133	0.0146
	<i>efp</i>	0.0000	0.0000	0.0079	0.0000
	<i>gyrB</i>	0.0000	0.0144	0.0131	0.0000
<i>X. euvesicatoria</i> ^T (ST E1)	<i>atpD</i>		0.0000	<i>0.0513</i>	<i>0.0498</i>
	<i>dnaK</i>		0.0000	0.0013	0.0026
	<i>efp</i>		0.0000	0.0079	0.0000
	<i>gyrB</i>		0.0000	0.0039	0.0144
<i>X. euvesicatoria</i> (ST E2)	<i>atpD</i>			0.0000	0.0121
	<i>dnaK</i>			0.0000	0.0039
	<i>efp</i>			0.0000	0.0079
	<i>gyrB</i>			0.0000	0.0131
<i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i> ^T	<i>atpD</i>	0.0054	<i>0.0441</i>	0.0067	0.0054
	<i>dnaK</i>	0.0013	0.0106	0.0119	0.0133
	<i>efp</i>	0.0000	0.0000	0.0079	0.0000
	<i>gyrB</i>	0.0172	0.0131	0.0118	0.0172

* Type strain.

[†] Genetic distances based on the Kimura's 2-Parameter method (Kimura, 1980). Italicized distances are for gene portion/strain combinations for which a recombination event was found by RDP3 (Martin *et al.*, 2005).

Supplementary Table 5. Genetic distances between *Xanthomonas cynarae*, *X. gardneri* and *X. hortorum* derived from sequence data obtained for four gene portions.

Species	Gene portion	Species			
		<i>X. cynarae</i> ^{T*}	<i>X. gardneri</i> ^{T†} (ST G1)	<i>X. gardneri</i> (ST G2)	<i>X. hortorum</i> ^T
<i>X. cynarae</i> ^T	<i>atpD</i>	0.0000 [†]	0.0000	0.0000	0.0190
	<i>dnaK</i>	0.0000	0.0013	0.0013	0.0133
	<i>efp</i>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0214
	<i>gyrB</i>	0.0000	0.0000	0.0158	0.0305
<i>X. gardneri</i> ^T (ST G1)	<i>atpD</i>		0.0000	0.0000	0.0190
	<i>dnaK</i>		0.0000	0.0000	0.0119
	<i>efp</i>		0.0000	0.0000	0.0214
	<i>gyrB</i>		0.0000	0.0158	0.0305
<i>X. gardneri</i> (ST G2)	<i>atpD</i>			0.0000	0.0190
	<i>dnaK</i>			0.0000	0.0119
	<i>efp</i>			0.0000	0.0214
	<i>gyrB</i>			0.0000	0.0360

* Type strain.

† Genetic distances based on the Kimura's 2-Parameter method (Kimura, 1980).

Fig. S1. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (Mougel *et al.*, 2002) showing the relationships among strains of *Xanthomonas vesicatoria* based on 196 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates type strains. Sequence types (ST) derived from MLSA data are indicated.

Fig. S1

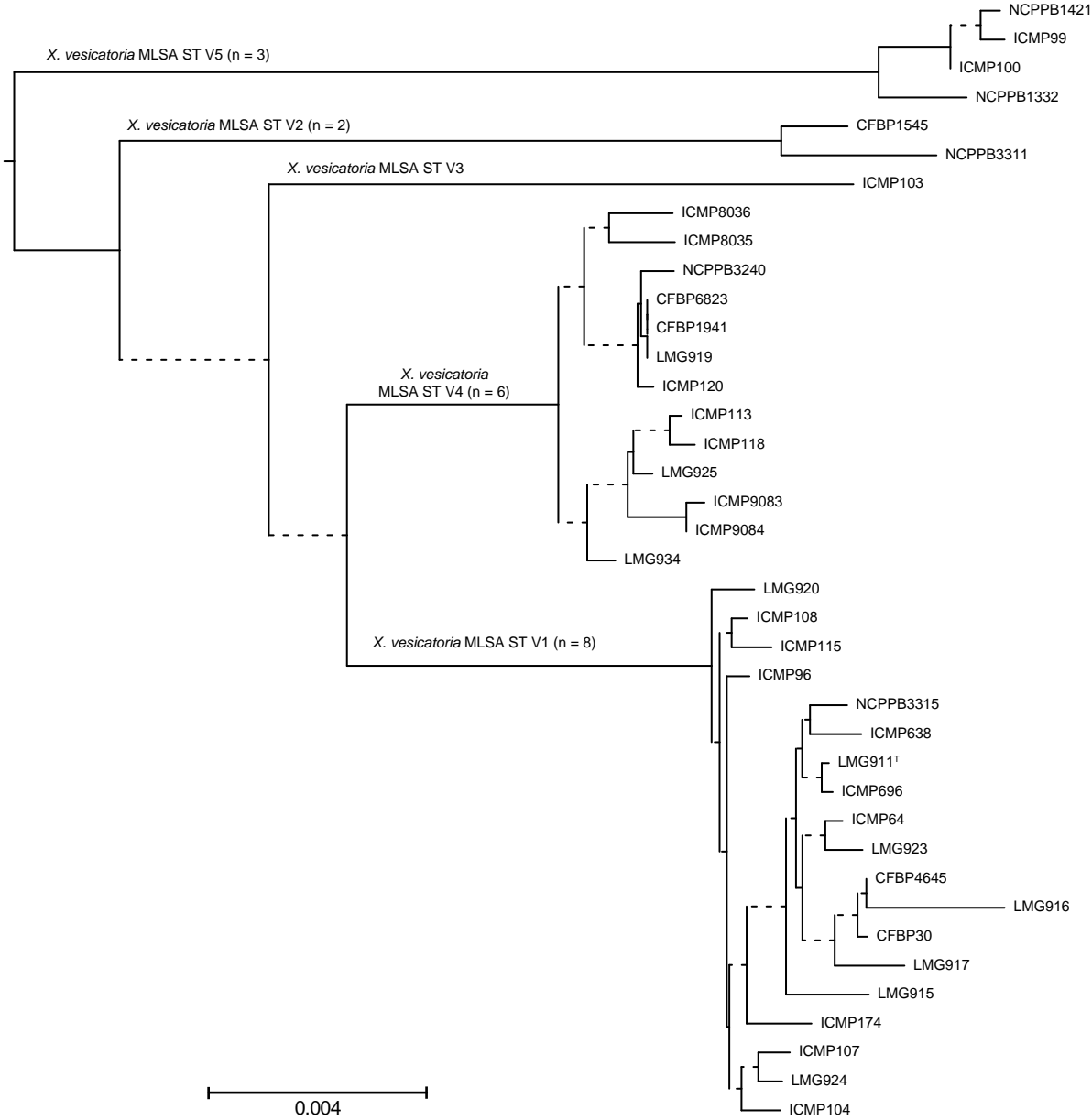


Fig. S2. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (Mougel *et al.*, 2002) showing the relationships among strains of *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. perforans* and *X. alfalfae* based on 254 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates type strains. Sequence types (ST) derived from MLSA data are indicated.

Fig. S2

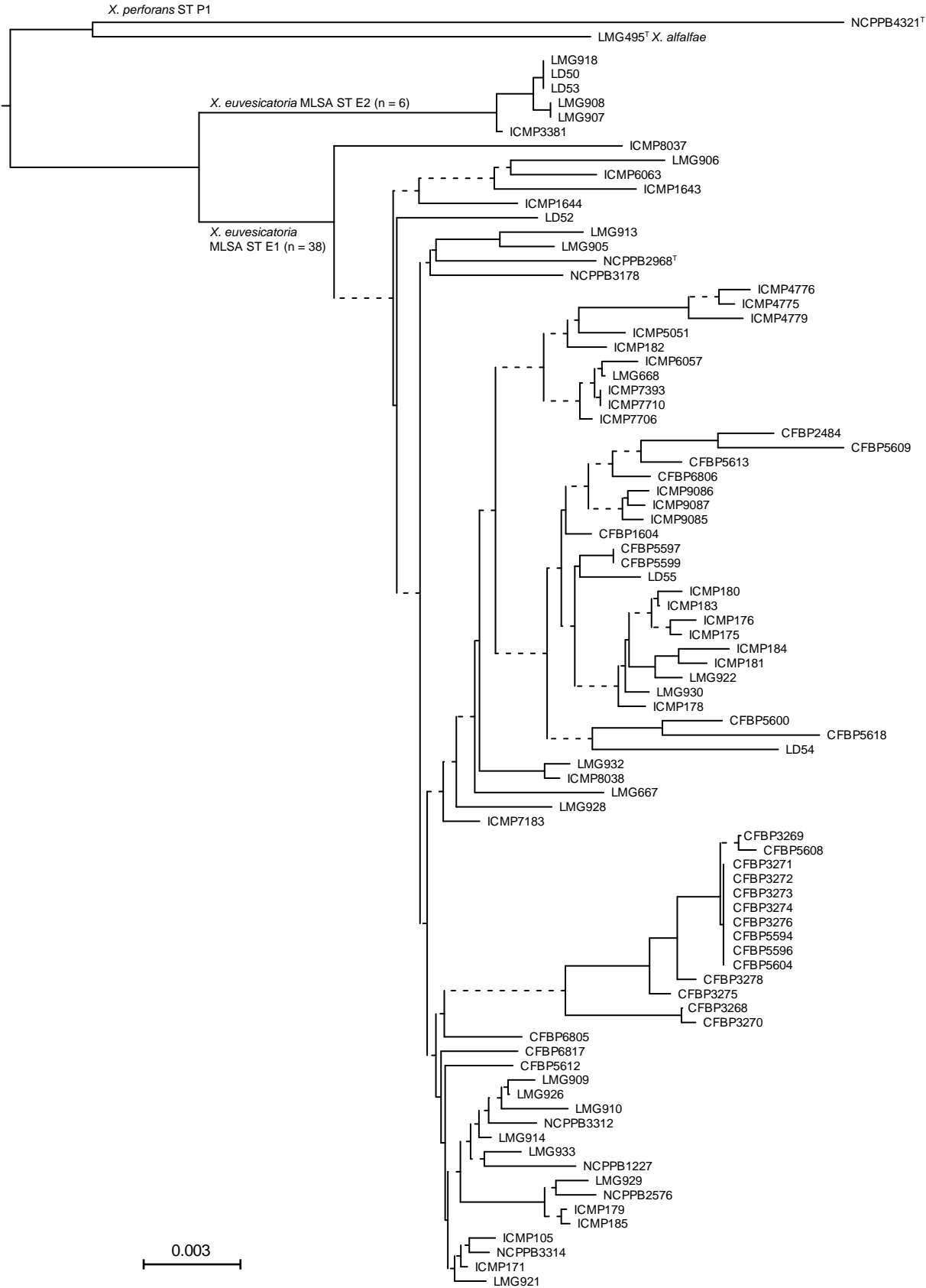


Fig. S3. Neighbor-joining tree derived from evolutionary genome divergences (Mougel *et al.*, 2002) showing the relationships among strains of *Xanthomonas gardneri* and *X. cynarae* based on 157 AFLP markers. Branches with bootstrap values lower than 80 % are represented by dotted lines. ^T indicates type strains. Sequence types (ST) derived from MLSA data are indicated.

Fig. S3

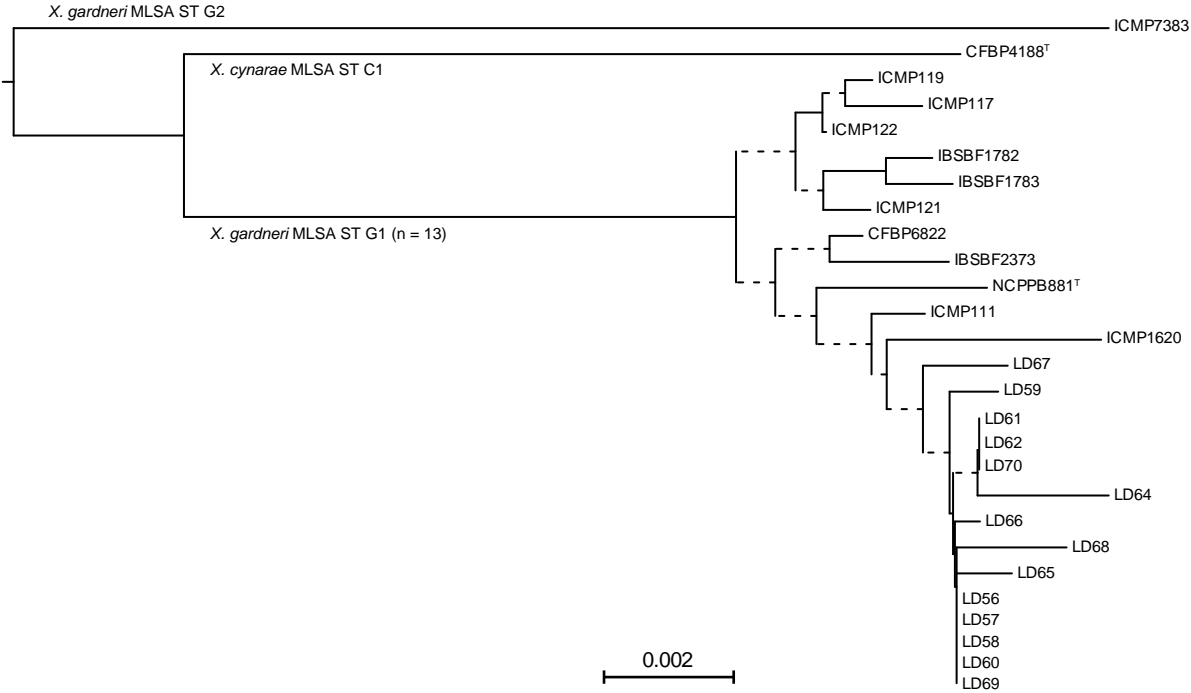
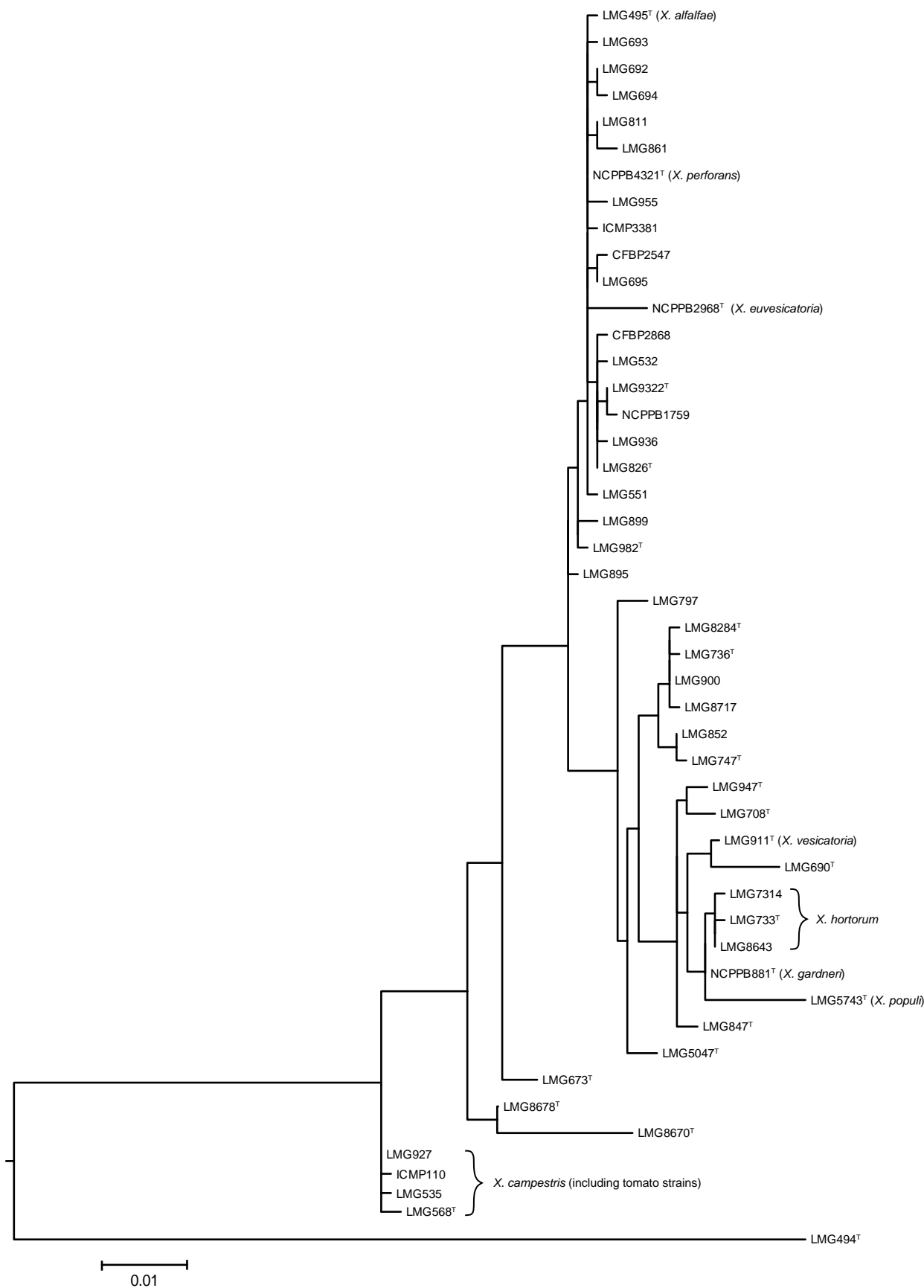


Fig. S4. Maximum likelihood tree derived from the JTT + I + G + F model based on concatenated peptide sequences showing the relationships among species of the *Xanthomonas campestris* core *sensu* Hauben *et al.* (1997). All branches were characterized by bootstrap values lower than 80 %. ^T indicates type strains.

Fig. S4



Chapitre IV :

Élaboration d'un protocole d'identification par
PCR des espèces responsables de la gale
bactérienne des solanées à graines

Chapitre IV : Elaboration d'un protocole d'identification par PCR des espèces responsables de la gale bactérienne des Solanées à graines

1. Problématique

Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, les *Xanthomonas* associées à la gale bactérienne de la tomate et du piment sont classés organismes de quarantaine au niveau de l'union européenne (liste A2 OEPP) et sont sujets également à un important contrôle au niveau international. En Europe, le statut d'organisme de quarantaine se justifie par le fait que cette maladie est absente des cultures en serre. La capacité de survie dans le sol ou dans les structures de la serre étant limitée, il est possible de maintenir les cultures en serre indemnes de la bactérie en instaurant une inspection des semences rigoureuses. Dans les régions tropicales comme les îles du Sud Ouest de l'Océan Indien, la maladie est fréquemment rencontrée sur tomate et piment, et parmi les méthodes de lutte préconisées, il est nécessaire de certifier la bonne santé des semis et d'assurer une veille phytosanitaire des cultures. Dans ces différents cas de figures, il y a donc nécessité de disposer de méthodes spécifiques et sensibles, capables de diagnostiquer la maladie et de désigner l'espèce de *Xanthomonas* en cause.

Le diagnostic de la gale bactérienne des Solanées à graines est compliqué par le fait qu'un même faciès de maladie peut être provoqué par cinq espèces génotypiquement et phénotypiquement différentes. Avant ce constat, seule une partie de la diversité était prise en compte dans la mise au point des outils de diagnostic (Benedict *et al.*, 1990; Kuflu & Cuppels, 1997). Parmi les méthodes mises au point plus récemment comme la PCR, il n'existe pas non plus de tests capables de reconnaître l'ensemble des souches associées à la gale bactérienne. Ainsi, certaines PCR ne ciblent qu'un type de souches responsables de la gale bactérienne. C'est le cas pour le test PCR développé à partir du gène *fimA* pour la détection de *X. vesicatoria* (Van Doorn *et al.*, 2001), et c'est également le cas pour deux PCR spécifiques mises au point pour l'amplification de *X. euvesicatoria*, une ciblant un fragment d'ADN non identifié issu de profils rep-PCR (Moretti *et al.*, 2009), l'autre ciblant un gène *rhs*

(Park *et al.*, 2009). Néanmoins dans ce dernier cas, cette PCR n'a pas été validée sur un grand nombre de souches. D'autres PCRs ont été développées pour amplifier plusieurs espèces. C'est le cas de la PCR développée par Leite ou encore par Obradovic (Leite *et al.*, 1995; Obradovic *et al.*, 2004b), toutes les deux ciblant la région *hrp*. Dans les deux cas, il y a un problème de spécificité puisqu'on a bien amplification de l'ensemble des espèces responsables de la gale bactérienne de la tomate mais également de beaucoup d'autres espèces de *Xanthomonas* pathogènes. Cuppels *et al.* ont également mis au point une PCR qui prend en compte l'ensemble des espèces responsables de la gale bactérienne, à partir d'un fragment d'ADN issu d'hybridation soustractive (Cuppels *et al.*, 2006). Cependant, d'après les auteurs, certaines souches appartenant à *X. perforans* ne sont pas amplifiées. Enfin, une PCR multiplex a été mise au point récemment pour la détection des 4 espèces de la gale bactérienne (Koenraad *et al.*, 2009). Néanmoins peu de détails sont disponibles sur cette PCR qui n'a d'ailleurs été validée que sur un nombre restreint de souches.

Dans ce contexte, notre travail s'est orienté vers la mise au point d'un protocole de PCR capable de reconnaître les différentes espèces associées à la gale bactérienne des Solanées à graines, et prenant en compte également la diversité intra-spécifique. Ce travail s'est appuyé sur les études de diversité réalisées à l'aide de l'outil AFLP sur l'ensemble de la collection mondiale de souches. En effet, ces analyses ont permis de mettre à jour des sous-groupes robustes à l'intérieur des espèces ou de pointer certaines souches atypiques.

C'est à partir de ces données AFLP que nous avons entrepris de sélectionner des marqueurs spécifiques de chacune des espèces associées à la gale bactérienne. Ces marqueurs ont été récupérés, testés pour leur spécificité et à partir de certains, nous avons désigné des amorces PCR spécifiques.

La première partie de notre travail a consisté à évaluer par nous-même les outils PCR existants qui prennent en compte les quatre espèces bactériennes concernées, la PCR mise au point par Cuppels et la multiplex PCR de Koenraad (Cuppels *et al.*, 2006; Koenraad *et al.*, 2009). Le but de ce travail était double :

- ▶ évaluer des amorces déjà publiées sur notre collection de souches, afin d'avoir une base de comparaison avec nos futures amorces
- ▶ utiliser comme matrices PCR certains des marqueurs déjà publiés s'ils s'avèrent spécifiques

La deuxième partie de l'étude s'est poursuivie par la recherche de fragments AFLP spécifiques aux espèces concernées, afin de les transformer en marqueur de PCR ciblée ou marqueur SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).

Nous nous sommes efforcés au cours de cette étude d'évaluer la méthode AFLP dans sa capacité à générer des fragments candidats. Pour cela, nous avons réalisé différentes analyses en périphérie, et notamment, nous avons vérifié des résultats prédits *in silico* (pour le génome de *X. euvesicatoria*).

2. Méthodologie

2.1. Cultures bactériennes et extraction d'ADN

Les cultures de souches bactériennes ainsi que les extractions d'ADN ont été menées comme décrits dans les publications 1 et 2.

2.2. AFLP

a. AFLP -2 bases sélectives

Nous avons exploité les données obtenues lors des études précédentes. Les conditions AFLP sont celles décrites dans les publications 1 et 2. L'amplification sélective a été réalisée à l'aide d'une amorce non marquée *MspI* + 1 base sélective (A ou C ou T ou G) et d'une amorce *SacI* + C marquée en 5' à l'aide des fluorophores 6-FAM, VIC, NED, et PET, respectivement. Les différents adaptateurs et amorces utilisés sont reportés Tableau 4.1. L'ensemble de la collection de souches associées à la gale bactérienne qui a été analysée est listée dans la publication 1 au chapitre 2. Le profil des souches non cibles LMG982 et LMG539 appartenant à *X. axonopodis* pv. *axonopodis* a également été ajouté à l'étude.

b. AFLP-4 bases sélectives

L'AFLP est réalisée dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, excepté que l'amplification sélective a été effectuée à l'aide de 4 bases sélectives, 2 sur l'amorce *SacI* marquée et 2 sur l'amorce *MspI*. Les amorces *SacI*+CA ou T ou C ou G sont marquées en 5' respectivement à l'aide des fluorophores 6-FAM, VIC, NED, et PET (Tableau 4.1). Soixante-quatre combinaisons ont été testées (*SacI*+CN X *MspI*+NN).

Nom	Séquence 5' > 3'	Taille de l'amplicon
AFLP		
<i>Adaptateurs</i>		
A1MSP	GACGATGAGTCCTGAG	
A2MSP	CGCTCAGGACTCATC	
A1SAC	CTCGTAGACTGCGTACAAGCT	
A2SAC	TGTACGCAGTCTACG	
<i>Amorces de pré-amplification</i>		
PMSP	GATGAGTCCTGAGCGG	
PSAC	TAGACTGCGTACAAGCTC	
<i>Amorces pour l'amplification sélective</i>		
Deux bases sélectives		
SacI+C	TAGACTGCGTACAAGCTCC	
MSPI+N	GATGAGTCCTGAGCGG + A, C, T, or G	
Quatre bases sélectives		
SacI+C+N	TAGACTGCGTACAAGCTCCT + A, C, T, ou G	
MSPI+2N	GATGAGTCCTGAGCGG + A, C, T, ou G et +A, C, T, ou G	
PCR		
<i>Amorces Cuppels</i>		
BSX1	TCGCCCATAGTCACCATTGGATAGACC	579 pb
BSX2	GCCTACGCCGAGAAGTTAGCCACCGAG	
<i>Amorces Koenraadt</i>		
Bs-XeF	CATGAAGAACTCGGCGTATCG	173 pb
Bs-XeR	GTCGGACATAGTGGACAC ATA C	
Bs-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	138 pb
Bs-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTGTC	
Bs-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC	154 pb
Bs-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG	
Bs-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	197 pb
Bs-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG	
<i>Amorces X. perforans</i>		
8U	CCTTGTAGCGCCCCAGCAG	257 pb
246L	CTTCGGTGGCGGCTTCGGA	
6U	CTCCTTGTAGCGCCCCAGCAG	211 pb
192L	TTGGAGCGAAAACGGTCACCTTCGT	
109U	CGCATCTTGCCCTACACCT	178 pb
267L20	GCCCTGATTGTTGCGTAAAG	
54U	TTCGCAATGTTGTTATAAGC	232 pb
267L19	CCCTGATTGTTGCGTAAAG	
62U	ACAGTGCGATGCAGAACCGT	118 pb
160L	CTCTTTGCCAGCGTATCTCC	
<i>Amorces X. gardneri</i>		
1726U	CCAGTAGGGGCGCAGATTGT	71 pb
1675L	CGCGTGGGGCGTGCCAGCAT	
2138U	CCGACCTGGTGCTCAACAAC	258 pb ou 273 pb*
2299L	GGGGTCGTAGGTTTCCAGT	
7383-1U	GCATCGCAATTGGTCA	116 pb
2299L	GGGGTCGTAGGTTTCCAGT	

Tableau 4.1 : adaptateurs et amorces utilisés dans cette étude.* 258 pb pour *X. gardneri* et *X. cynarae*, 273 pb pour *X. hortorum* pv. *hederae*

Les souches utilisées dans la sélection des fragments communs à *X. perforans* et *X. euvesicatoria* sont : LA85-2, LB216, LH4-1, LH5, LMG668, LMG905, LMG907, LMG909, LMG910, LMG913, LMG922, LMG926, LMG929, LMG930, LMG933, NCPPB 2968 et LB101-1, LB102-2, LB103-1, LB103-2, LB103-3, LB273-1, LB273-2, LB273-3, LB273-4, LH3, NCPPB4321.

Pour les marqueurs spécifiques à *X. perforans*, nous avons analysé les souches : LB101-1, LB102-2, LB103-1, LB103-2, LB103-3, LB273-1, LB273-2, LB273-3, LB273-4, LH3, NCPPB4321, NCPPB 2968, LMG 922, LH4-1, LH5, LMG 910. Pour *X. gardneri*, la sélection des marqueurs a été réalisée à l'aide des souches : NCPP881, ICMP111, ICMP122, JS750-1, JQ711, JQ725, LD59, LD69, CFBP6822, IBSF1782, IBSF1783, LD67, ICMP119, JS749-2, ICMP117 et ICMP7383.

Les données obtenues sur le séquenceur ont été analysées à l'aide du logiciel GeneMapper (GeneMapper Software version 4.0 (Applied Biosystems)). L'AFLP a été réalisée également à l'aide des mêmes amorces non marquées pour un passage sur gel de polyacrylamide.

2.3. Récupération des fragments d'intérêts

Les produits d'amplification AFLP ont été séparés sur gel de polyacrylamide à 5% (Risterucci *et al.*, 2000), puis colorés au nitrate d'argent (Qu *et al.*, 2005). Après séchage du gel, les bandes d'intérêts ont été récupérées à l'aide d'un scalpel, incubées pendant 2h à 60°C dans 50 µl de Tampon Taq polymérase Red Goldstar. Cinq µl de cette solution ont été prélevées pour effectuer une amplification sélective avec les amorces utilisées précédemment. La taille des fragments amplifiés a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (2 heures, 110 volts). Les fragments d'ADN ont ensuite été clonés dans PGEM-T Easy Vector (Promega) suivant les recommandations du fournisseur, puis séquencées (Beckman Coulter Genomics, UK).

Les séquences des différents fragments ont été comparées aux séquences disponibles dans la base de données NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) afin de mettre à jour des homologues avec des séquences existantes (Blastn et Blastx).

2.4. PCR

a. Evaluation des PCR Cuppels et Koenraadt

La liste de souches utilisées dans l'évaluation des différentes amorces est présentée Tableau 2a et 2b.

Il y a 124 souches associées à la gale bactérienne de la tomate et du piment, dont 33 souches de *X. euvesicatoria*, 44 souches de *X. vesicatoria*, 12 souches de *X. perforans* et 35 souches de *X. gardneri*. Il y a également 68 souches non cibles et parmi elles, d'autres genres et espèces bactériennes pathogènes des Solanées ou pathogènes d'autres hôtes végétaux, ainsi que des espèces bactériennes saprophytes, dont certaines isolées de tomate.

Toutes les amplifications PCR sont réalisées dans un thermocycleur 9700 (Applied Biosystem). Chaque PCR a été répétée au moins une fois. Les amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 4.1. Dans le cas des amorces BSX1/2, les conditions d'amplification sont celles décrites dans la publication (Cuppels *et al.*, 2006), excepté la concentration en dNTPs. En effet, nous avons testé la concentration indiquée, très faible (0,2 μ M) sans obtenir de résultats, et nous avons opté pour une concentration mille fois supérieure, proche des concentrations utilisées dans les protocoles standards de PCR. Concernant les amorces Koenraadt, aucune donnée n'est fournie dans le document, et nous avons appliqué un protocole standard que nous avons optimisé par la suite.

PCR Cuppels

Constitution du Mix

Tampon 10X	2.5 μ l
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	200 μ M de chaque
BSX1/BSX2	1 μ M de chaque amorce
Taq polymerase (RedGold,)	1,25 U
ADN (5-10 ng/ μ l)	1 μ l
	QSP 25 μ l H ₂ O ultra pure

Cycles d'amplification

95°C	2 min	
95°C	40 sec	} X40 cycles
63°C	40 sec	
72°C	50 sec	

72°C 5 min

Les produits d'amplification sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 2% (Seakem LE, Tebu) pour 2 heures à 110 V puis sont révélés aux UV après un bain de 15 min dans le bromure d'éthidium.

PCR Koenraad

Constitution du mix

Tampon 10X	2.5 µl
MgCl ₂	3 mM
dNTPs	100 µM de chaque
Amorces	0,2µM de chaque
Taq polymerase (RedGold,)	1,25 U
ADN (5-10 ng/µl)	1 µl
	QSP 25 µl H ₂ O ultra pure

Cycles d'amplification

95°C 5 min

94°C 30 sec

52-54°C*30 sec

72°C 40 sec

72°C 7 min

x 30 cycles

* : T= 52°C pour Bs-XgF et Bs-XgR

T= 53°C pour Bs-XeF et Bs-XeR

T=54°C pour Bs-XpF et Bs-XpR

et pour Bs-XvF et Bs-XvR

Les produits d'amplification sont séparés par migration électrophorétique sur gel d'agarose 2 % (Nusieve LE, TEBU) pour 2 heures à 110 V, puis sont révélés aux UV après un bain de 15 min dans le bromure d'éthidium.

Taxonomie et diagnostic des *Xanthomonas* de la gale bactérienne des Solanées

KOENRAADT															CUPPELS				PERFORANS					GARDNERI	
Taxon	Hôte	Souches	Bs-Xg	Bs-Xe	Bs-Xv	Bs-Xp	BSX	fragment 1 8U/246L	fragment 1 6U/192L	fragment 1 62U/160L	fragment 2 54U/267L19	fragment 2 109U/267L20	7383-1U/2299L												
			154 pb	173 pb	138 pb	197 pb	579 pb	257 pb	211 pb	118 pb	232 pb	178 pb	116 pb												
X. gardneri	inconnu	CFBP6822	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	IBSBF1782	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	IBSBF1783	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD58	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD59	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD60	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD61	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD62	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD65	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD66	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD67	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD68	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD69	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD70	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	LD56	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+												
	S. lycopersicum	ICMP111	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP117	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP119	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP121	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP122	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP7383	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JQ711	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JQ724	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JQ725	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JS749-1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JS749-2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JS749-3	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	JS750-1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	C. annuum	JS750-2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	C. annuum	JS750-3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	IBSBF2373	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	ICMP1620	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
	S. lycopersicum	NCPB881 ^T	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+											
X. perforans	S. lycopersicum	LB273-1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB273-2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB273-3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB273-4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB101-1	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB101-2	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB102-2	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB103-1	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB103-2	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-												
	S. lycopersicum	LB103-3	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-												
	S. lycopersicum	NCPB4321 ^T	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-												

Taxonomie et diagnostic des *Xanthomonas* de la gale bactérienne des Solanées

Taxon	Hôte	Souches	KOENRAADT				CUPPELS		PERFORANS					GARDNERI	
			Bs-Xg	Bs-Xe	Bs-Xv	Bs-Xp	BSX	fragment 1 8U/246L	fragment 1 6U/192L	fragment 3 62U/160L	fragment 2 54U/267L19	fragment 2 109U/267L20	fragment 2 178 pb	7383-1U/2299L	116 pb
			154 pb	173 pb	138 pb	197 pb	579 pb	257 pb	211 pb	118 pb	232 pb	178 pb	116 pb		
	<i>S. lycopersicum</i>	LH3	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	inconnu	CFBP6823	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP8035	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP8036	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG934	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	CFBP30	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP113	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP115	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP118	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP120	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP174	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP9083	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP9084	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG923	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG924	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG925	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	NCPPB1421	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	NCPPB3315	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	LMG915	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG920	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	NCPPB3311	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	NCPPB1332	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LC160	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LC161	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LC162	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	CFBP4645	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP100	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP638	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP64	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP696	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP99	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG911 ^T	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG916	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG917	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	JS683-1	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	JS683-2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	CFBP1545	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	CFBP1941	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	NCPPB3240	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	ICMP103	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP104	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP107	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP108	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	ICMP96	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>S. lycopersicum</i>	LMG919	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

X. vesicatoria

Taxonomie et diagnostic des *Xanthomonas* de la gale bactérienne des Solanées

KOENRAADT			CUPPELS		PERFORANS					GARDNERI			
Taxon	Hôte	Souches	Bs-Xg	Bs-Xe	Bs-Xv	Bs-Xp	BSX	fragment 1 8U/246L	fragment 1 6U/192L	fragment 3 62U/160L	fragment 2 54U/267L19	fragment 2 109U/267L20	7383-1U/2299L
			154 pb	173 pb	138 pb	197 pb	579 pb	257 pb	211 pb	118 pb	232 pb	178 pb	116 pb
X. euvesicatoria	C. annuum	LD50	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LD53	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	ICMP3381	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LMG667	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LMG668	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Capsicum sp.	LMG909	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LMG910	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Capsicum sp.	LMG913	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LMG914	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. frutescens	LMG926	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LMG929	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	C. frutescens	LMG930	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	L. esculentum	LMG931	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. frutescens	LMG932	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. frutescens	LMG933	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	CFBP5600	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. frutescens	NCPBP2968 ^T	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	CFBP6805	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LA84-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LB226-4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LE82-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LH5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	ICMP5051	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	NCPBP1227	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	JW7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LA127-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	LB102_1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C. annuum	LD128-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	CFBP6806	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	CFBP6817	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	CFBP3276	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	inconnu	NCPBP3314	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	S. lycopersicum	ICMP175	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 4.2a : souches bactériennes associées la gale bactérienne des Solanées à graines utilisées dans cette étude, et réponses aux différents tests PCR effectués.
+ amplicon de la taille attendue, (+) légère amplification à la taille attendue, - pas d'amplification, ++ bandes d'amplification supplémentaires, +* amplicon de taille différente ; T : souche type ; en grisé : non déterminé.

Taxon	Souches	KOENRAADT					CUPELS		PERFORANS					GARDNERI
		Bs-Xg	Bs-Xe	Bs-Xv	Bs-Xp	BSX	fragment 1 8U/246L	fragment 1 257 pb	fragment 1 6U/192L	fragment 1 211 pb	fragment 3 62U/160L	fragment 2 54U/267L19	fragment 2 109U/267L20	
		154 pb	173 pb	138 pb	197 pb	579 pb					118 pb	232 pb	178 pb	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>begoniae</i>	sous-groupe génétique 9.1													7383-1U/2299L
	LMG551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	116 pb
	LMG7303T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	
	CFBP2524	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>alfalfae</i> (syn. <i>X. alfalfae</i> subsp. <i>citrumelonis</i>)	sous-groupe génétique 9.2													
	JJ238-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	JJ238-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	JJ238-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFBP2910	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG497	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG8019	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG675 [†]	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	LMG861 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG686	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG691 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG692 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG693 [†]	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	LMG694 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG698 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG811 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>erythrinae</i> (syn. <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phyllanthi</i>)	sous-groupe génétique 9.3													
	LMG539	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG901 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG8285	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	sous-groupe génétique 9.4													
	LMG8014	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	JR518-3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG695	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>dieffenbachiae</i> (X. citri pv. <i>malvacearum</i>)	sous-groupe génétique 9.5													
	C39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	JA159-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFBP2525 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IAPAR306 [®]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG548	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	LMG558 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG1716 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CFBP2933	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	LMG761 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> (X. citri pv. <i>malvacearum</i>)	LMG7429	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Taxonomie et diagnostic des *Xanthomonas* de la gale bactérienne des Solanées

Taxon	KOENRAADT				CUPPELS		PERFORANS				GARDNERI	
	Bs-Xg 154 pb	Bs-Xe 173 pb	Bs-Xv 138 pb	Bs-Xp 197 pb	BSX 579 pb	fragment 1 8U/246L 257 pb	fragment 1 6U/192L 211 pb	fragment 3 62U/160L 118 pb	fragment 2 54U/267L19 232 pb	fragment 2 109U/267L20 178 pb	7383-1U/2299L 116 pb	
Souches												
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>cajani</i> LMG7387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
autres espèces												
<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i> CFBP4925 (LMG733)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>X. bromi</i> CFBP1976	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. fragariae</i> CFBP2157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> CFBP5251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> CFBP4182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>X. cynarae</i> CFBP4188	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>X. cynarae</i> CFBP4209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
<i>X. sacchari</i> CFBP4641	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. melonis</i> CFBP4644	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. codiae</i> CFBP4690	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. albilineans</i> CFBP2523	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. sacchari</i> LMG471	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. perforans</i> non pathogène LMG904	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> LMG747	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i> CFBP2528	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> LMG852	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
autres genres												
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> LMG7333	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Pseudomonas corrugata</i> LMG2172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Ralstonia eutropha</i> (<i>Cupriavidus necator</i>) LMG1199 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>R. solanacearum</i> (phylotype I) GM1100 (Run54)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>R. solanacearum</i> (phylotype II) K60 (Run65)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>R. solanacearum</i> (phylotype I) MAFF211266 (Run69)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>R. solanacearum</i> (phylotype II) NCPBP3987 (Run79)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> LMG5093	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>R. pickettii</i> LMG5942	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. andropogonis</i> (<i>Burkholderia andropogonis</i>) LMG2129 [†]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. cichorii</i> LMG2162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. putida</i> LMG16206	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>P. fluorescens</i> LMG1794	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Burkholderia cepacia</i> LMG1222	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Erwinia chrysanthemi</i> LMG2804	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau 4.2b : souches bactériennes non cibles utilisées dans cette étude, et réponses aux différents tests PCR effectués + amplicon de la taille attendue, (+) légère amplification à la taille attendue, -pas d'amplification. ^T : pathotype ou souche type. En grisé : non déterminé

b. Evaluation des fragments AFLP

Plusieurs paires d'amorces PCR ont été désignées sur les fragments d'intérêt à l'aide du logiciel OLIGO Primer Analysis Software (v6.89) et ont été évaluées sur la collection de souches cibles et non cibles présentée Tableau 2a et 2b. La liste de toutes les amorces utilisées au cours de cette étude est reportée Tableau 4.1. Les protocoles d'amplification ont été optimisés au cours du temps en faisant varier la concentration en $MgCl_2$ ainsi que la température d'hybridation, dans une recherche de spécificité. Dans la plupart des cas, afin d'optimiser les réactions PCR nous avons réalisé des gradients de température d'hybridation (Thermocycleur Eppendorf Master Cycler).

Dans un premier temps, les PCRs ont été réalisées à 3mM $MgCl_2$ puis cette concentration a été baissée à 2 mM pour limiter les amplifications aspécifiques.

Ainsi, le protocole de base suivant a été utilisé pour toutes les amorces testées pour l'amplification de *X. perforans* et *X. gardneri* :

Protocole de base PCR pour l'amplification de *X. perforans* et *X. gardneri*

Constitution du mix

Tampon 10X	2.5 μ l
$MgCl_2$	2 mM
dNTPs	100 μ M de chaque
Amorces	0,2 μ M de chaque amorce
Taq polymerase (RedGold,)	1,25 U
ADN (5-10 ng/ μ l)	1 μ l
	QSP 25 μ l H ₂ O ultra pure

Cycles d'amplification

Au niveau des cycles d'amplification, nous avons suivi pour toutes les PCRs un protocole standard adapté à l'amplification de petits fragments :

95°C 5 '	
94°C 30s	} 30 cycles
T°C 30s	
72°C 40s	
72°C 7 '	

Nous avons répertorié dans le tableau ci dessous (Tableau 4.3) les différentes températures d'hybridation (**T**) testées en fonction des paires d'amorces utilisées. Les températures en gras

sont celles pour lesquelles nous avons obtenu les meilleurs compromis en terme de spécificité et d'efficacité PCR et sont celles utilisées pour les PCRs présentées Tableau 4.2. a et b.

	T pour test de gradients de température (de 10 à 12 points) sur quelques souches	T pour test sur collection
8U/246L	46,4°C à 65,6°C et 58,2°C à 72°C testés sur NCPPB4321 et LB273-3 (<i>X. perforans</i>), FDC12 (<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>) et LMG 907 (<i>X. euvesicatoria</i>)	68°C
6U/192L	59°C à 75,5°C testés sur NCPPB4321 et LB273-3 (<i>X. perforans</i>), FDC12 (<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>) et NCPPB2968 (<i>X. euvesicatoria</i>)	70°C
62U/160L	52°C à 68,5.°C testé sur NCPPB4321 et LB273-2 (<i>X. perforans</i>), LMG904 (<i>X. perforans</i> non pathogène), CFBP5241 (<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	62°C
54U/ 267L19	52°C à 68,5.°C testé sur NCPPB4321 et LB273-2 (<i>X. perforans</i>), LMG904 (<i>X. perforans</i> non pathogène), CFBP5241 (<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	57°C, 60°C,
109U /267L20	-	63°C, 65°C
7383-1U/2299L	54°C à 67,5°C testé sur NCPPB 881 et ICMP 7383 (<i>X. gardneri</i>), FDC12 (<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>) et CFBP 4188 (<i>X. cynarae</i>) 62°C à 70,4°C testé sur NCPPB 881 (<i>X. gardneri</i>) , LMG 733 (<i>X. hortorum</i> pv. <i>hederae</i>)	60°C, 62°C, 63°C

Tableau 4.3 : PCR *X. perforans* et *X. gardneri*: essais de différentes températures d'hybridation avec les différentes paires d'amorces utilisées

c. Amplification et clonage de la zone intergénique chez *X. gardneri*

L'amplification de la zone intergénique chez différentes souches de *X. gardneri* à l'aide des amorces 1726U/1675L (amplicon de 71 pb) ainsi que le clonage de la zone intergénique chez différentes souches (amplicons de 258 pb pour *X. gardneri*, *X. cynarae* ou 274 pb pour *X. hortorum* pv. *hederae*) à l'aide des amorces 2138U/2299L a été réalisé selon le protocole de base défini au paragraphe précédent excepté la concentration en MgCl₂ (3mM). Les conditions d'amplification sont également les mêmes, avec une température d'hybridation de 60°C.

3. Principaux résultats et discussion

3.1. Evaluation de différentes amorces sur une collection de souches associées à la gale bactérienne de la tomate

Les résultats des amplifications PCR réalisées avec les différentes amorces sont reportés Tableau 4.2a et b.

Les amorces BSX1/BSX2 (Cuppels) sont supposées amplifier les quatre espèces *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* et *X. perforans*. Il y a à la fois des problèmes d'inclusivité (capacité à amplifier les souches cibles) et des problèmes d'exclusivité (capacité à exclure les souches non cibles). Par exemple sur l'ensemble des souches appartenant à *X. gardneri*, les 2/3 des souches ne sont pas amplifiées. Il en est de même pour les souches de *X. perforans* (Figure 4.1a). Concernant l'exclusivité, il y a amplification de quelques souches non cibles appartenant à *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Il y a de surcroît des bandes d'amplification aspécifiques en plus du fragment de taille attendue de 579 pb.

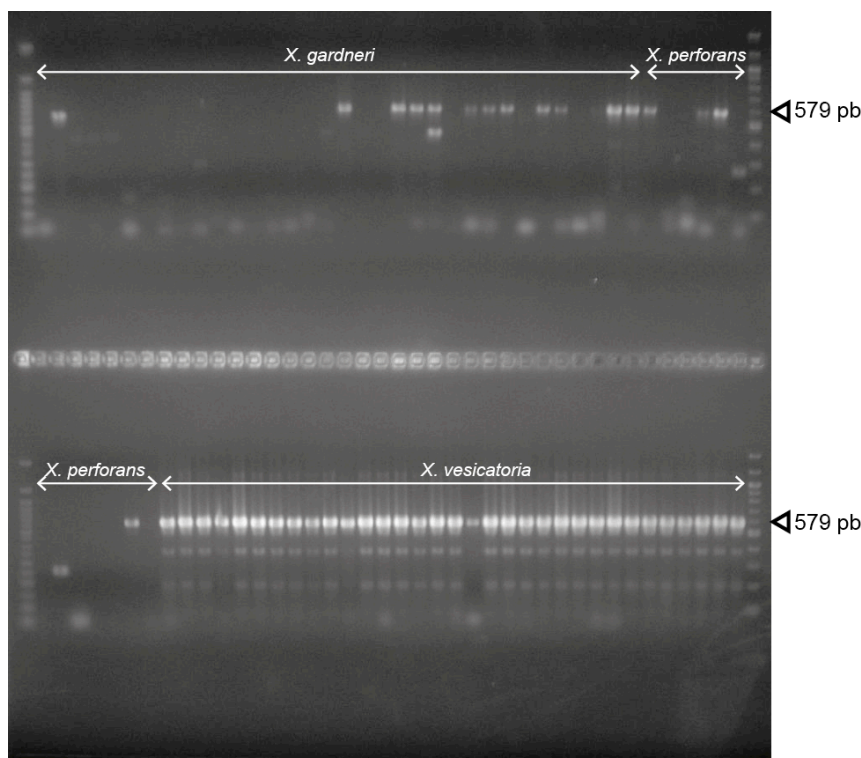


Figure 4.1a : PCR réalisée avec les amorces BSX1/BSX2 (Cuppels) sur différentes espèces associées à la gale bactérienne

Pour les amorces Koenraadt, les résultats sont variables suivant les paires d'amorces testées.

Un fragment d'ADN de la taille attendue (173 pb) est amplifié à l'aide de la paire d'amorces Bs-XeF, Bs-XeR pour l'ensemble des souches cibles *X. euvesicatoria*.

De même, un fragment de 138 pb est amplifié pour toutes les souches de *X. vesicatoria* avec les amorces Bs-XvF, Bs-XvR (Figure 4.1b).



Figure 4.1b : PCR réalisée avec les amorces Bs-XvF et Bs-XvR (Koenraadt) sur différentes souches de *X. vesicatoria*

1 à 8: ICMP118, ICMP103, NCPPB1332, CFBP1545, LMG916, ICMP120, LMG911, ICM9083. M= marqueur de taille (100 pb), Θ: témoin négatif

Pour *X. gardneri*, un fragment de 154 pb est obtenu pour l'ensemble des souches cibles avec les amorces Bs-XgF, Bs-XgR, excepté la souche atypique ICMP 7383 (elle est clairement séparée des autres souches de *X. gardneri* en AFLP; son pouvoir pathogène a été confirmé sur tomate et piment/poivron) (Figure 4.1c).

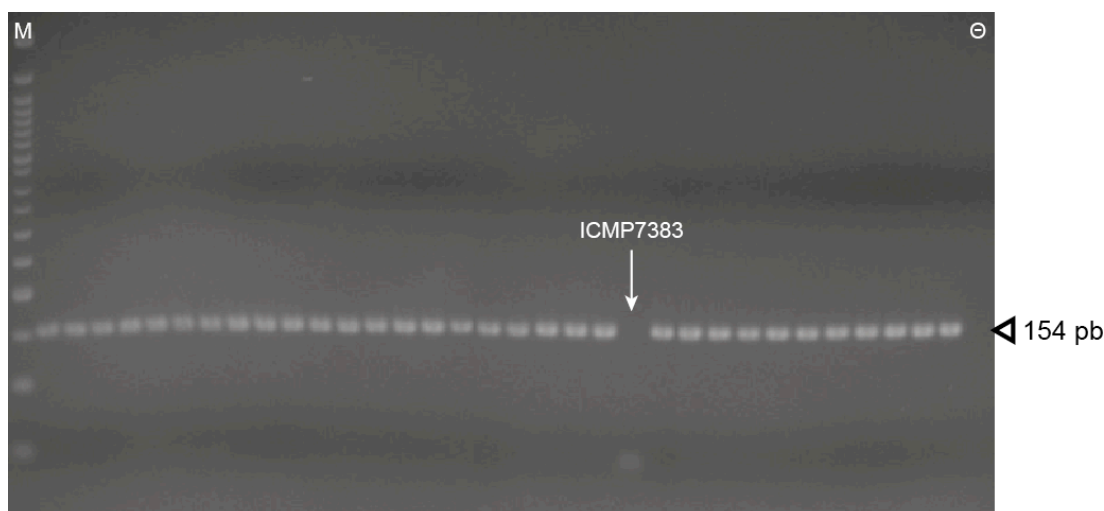


Figure 4.1c : PCR réalisée avec les amorces Bs-XgF et Bs-XgR (Koenraadt) sur l'ensemble des souches de *X. gardneri*

M : marqueur de taille (50pb), Θ : témoin négatif.

Pour *X. perforans*, l'inclusivité n'est pas bonne, un fragment de 197 pb est amplifié seulement pour 5 des 11 souches testées avec la paire d'amorces Bs-XpF Bs-XpR (Figure. 4.1d).

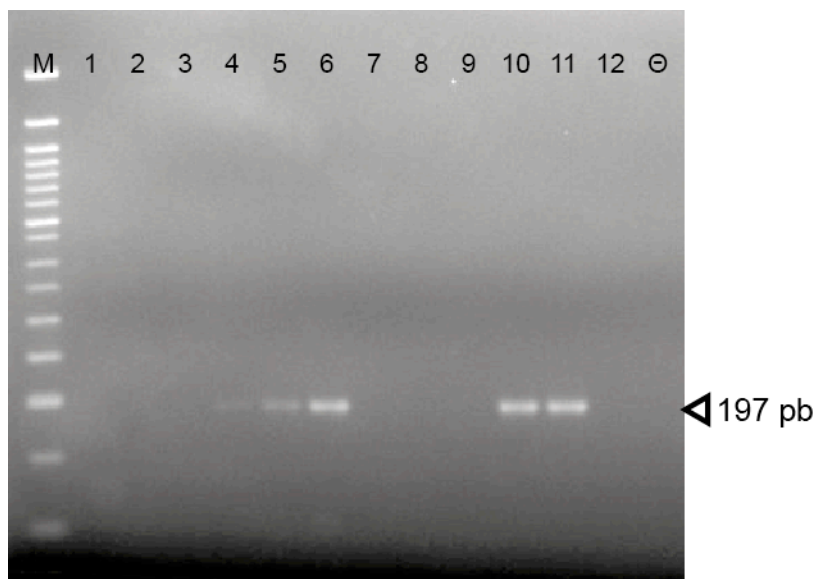


Figure 4.1d : PCR réalisée avec les amorces Bs-XgF et Bs-XgR (Koenraadt) sur différentes souches de *X. perforans*

De 1 à 12 : LB273-2, LB273-3, LB273-4, LB101-1, LB101-2, LB102-2, LB103-1, LB103-2, LB103-3, NCPPB4321, LH3 et LB273-1. M : Marqueur de taille (50pb). Θ: témoin négatif

Au niveau de l'exclusivité, les PCRs développées par Koenraadt présentent une très bonne spécificité.

La PCR *X. perforans* n'amplifie pas les autres espèces liées à la gale bactérienne et n'amplifie aucune souche non cible testée. Il en est de même pour les souches appartenant à *X. vesicatoria*.

C'est le cas également pour *X. gardneri*. Même les souches très proches appartenant à l'espèce synonyme *cynarae* ne sont pas amplifiées.

Un résultat similaire est obtenu pour *X. euvesicatoria*, excepté pour une des deux souches de *X. alfalfae* (Tableau 2.b) pour laquelle on observe un amplicon de 173 pb. Nous avons vu néanmoins que cette espèce était très probablement synonyme de *X. euvesicatoria* et *X. perforans*.

Suite à ces essais, nous avons décidé de concentrer nos efforts sur la recherche de marqueurs spécifiques chez *X. gardneri* et *X. perforans*, toutes les PCRs testées sur ces deux espèces montrant des problèmes d'inclusivité. Pour *X. gardneri*, une seule souche n'est pas amplifiée (ICMP 7383). Son pouvoir pathogène a été vérifié sur piment et tomate. Comme nous n'avons pas de données sur l'occurrence actuelle de cette souche originaire de Nouvelle-Zélande et sa

capacité à se disséminer, il est important de pouvoir la détecter. Dans le cas de *X. perforans*, il nous a semblé intéressant de développer des outils complémentaires, c'est à dire une PCR capable de reconnaître les deux espèces *X. perforans* et *X. euvesicatoria*, au vu de la grande proximité génétique de ces taxons, et une PCR uniquement dédiée à *X. perforans*.

3.2. Recherche de marqueurs spécifiques par la technique AFLP

Les données AFLP obtenues dans les études précédentes (cf. publications 1 et 2) sur la collection de souches associées à la gale bactérienne, nous ont permis de repérer des fragments potentiellement spécifiques à chacune des espèces concernées (c'est à dire absents chez les trois autres espèces et également chez les souches non cibles), de taille comprise entre 50pb et 500 pb. Il y a ainsi 26 marqueurs privés pour *X. vesicatoria*, 42 pour *X. gardneri*, 16 pour *X. euvesicatoria*, 8 pour *X. perforans* et 29 communs à *X. euvesicatoria* et *X. perforans*.

Afin de récupérer physiquement les fragments d'intérêts, il a été nécessaire de passer par une étape d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, plus résolutif que le gel d'agarose. Les premiers essais sur gel ont montré une complexité importante des profils, rendant difficile la récupération des bandes d'intérêts. Nous avons augmenté alors le nombre de bases sélectives au niveau de l'AFLP, afin de simplifier ces profils. Les tests ont été menés sur le séquenceur avec plusieurs souches représentatives des quatre espèces de *Xanthomonas* spp. des Solanées. Pour les fragments d'intérêt repérés dans les données AFLP avec 2 bases sélectives, nous avons réalisé les différentes combinaisons d'amorces avec 4 bases sélectives et nous avons sélectionné celles pour lesquelles nous avons toujours amplification des fragments d'intérêt. Les fragments ont été récupérés après migration sur gel de polyacrylamide et ont été séquencés. Un exemple de gel est montré Figure 4.2.

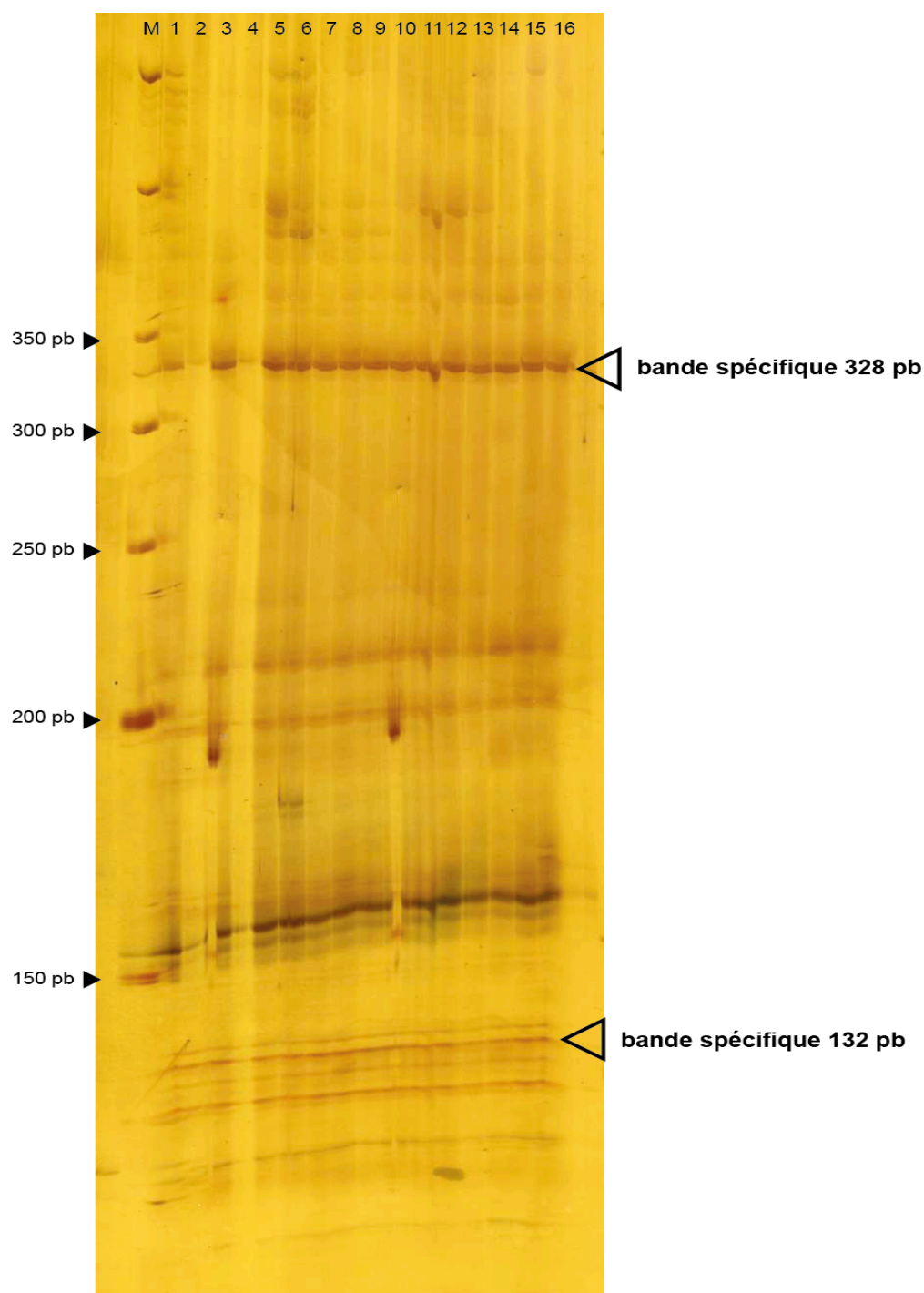


Figure 4.2 : exemple de marqueurs spécifiques obtenus sur gel de polyacrylamide après AFLP en conditions *SacI*+CA *MspI*+TC
M : marqueur de taille (50 pb). Puits 1 à 16, souches de *X. gardneri* : NCPP881, ICMP111, ICMP122, JS750-1, JQ711, JQ725, LD59, LD69, CFBP6822, IBSF1782, IBSF1783, LD67, ICMP119, JS749-2, ICMP117 et ICMP1620.

a. *Xanthomonas perforans*

Recherche de marqueurs communs avec X. euvesicatoria

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier des séquences candidates pour développer une PCR commune à ces deux espèces. La recherche des conditions AFLP-4 bases sélectives amplifiant les marqueurs repérés en AFLP-2 bases sélectives a été réalisée dans un premier temps sur 2 souches de *X. euvesicatoria* et 2 souches de *X. perforans*. Ce tri est illustré Tableau 4.4 pour la condition *SacI*+C *MspI*+T et les 16 conditions *SacI*+CN/*MspI*+TN. Ces résultats ont montré que dans quelques cas (146 pb, 149 pb), il n'y avait pas d'ambiguïté concernant la condition sélective amplifiant le fragment attendu pour les 4 souches étudiées. Dans d'autres cas, il y a plusieurs conditions qui semblent amplifier le fragment de taille attendu, ce qui témoigne de la présence de plusieurs fragments de taille identique ou proche dans les profils AFLP en 2 bases sélectives, c'est le cas par exemple du fragment de 102 pb. Dans le cas du fragment de 204 pb, aucune condition n'amplifie le fragment désiré pour toutes les souches. Il peut y avoir également pour certaines conditions des pics d'amplification légèrement décalés par rapport à la taille attendue ou bien encore des pics présentant une amplitude inférieure au seuil fixé (500).

La majorité des conditions donnant une amplification d'un fragment de la taille attendue ou proche pour au moins une des souches de chaque espèce, a été à nouveau testée par électrophorèse capillaire, cette fois ci sur 11 souches de *X. perforans* et 16 souches de *X. euvesicatoria* (Tableau 4.5). Aucune condition n'amplifie la totalité des souches. Par contre pour un fragment donné, on trouve à chaque fois une condition qui amplifie une majorité de souches. Ces résultats montrent également que différentes conditions amplifient des fragments de taille identique (cas des fragments les plus petits, 102 pb, 109 pb, 113 pb).

Pour certaines des conditions les plus évidentes, les fragments ont été isolés, clonés et séquencés pour des souches de *X. perforans*. Les résultats de séquençage sont présentés Tableau 4.6. Comme nous nous y attendions, toutes les séquences sont très homologues (97% à 100%) à des séquences du génome de *X. euvesicatoria*. Par contre aucune des séquences n'est spécifique à *X. perforans/X. euvesicatoria* puisqu'on trouve dans tous les cas de l'homologie avec d'autres *Xanthomonas*, et en particulier *X. citri* pv. *citri*, la souche séquencée la plus proche de *X. euvesicatoria*.

	102 ^a				109				113				147				159				161				204			
	Euv1	Euv2	Per1	Perf2	Euv1	Euv2	Per1	Perf2	Euv1	Euv2	Per1	Perf2	Euv1	Euv2	Per1	Perf2	Euv1	Euv2	Per1	Perf2	Euv1	Euv2	Per1	Perf2				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	9	0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TA	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TC	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TT	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TG	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TT	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TG	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TA	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				

Tableau 4.4 : amplification des marqueurs communs à *X. perforans* et *X. euvesicatoria* en conditions AFLP 4 bases sélectives (*SacI*+CN *Mspi*+NN)

0 : pas d'amplification ; 1 : amplification d'un fragment à la taille attendue, avec une amplitude correcte (pic >500) ; 9 : Amplification d'un fragment de taille légèrement décalée (jusqu'à 1 base) ou 9* : pic peu élevé (en dessous de 500).

	102 ^a						109						113						147						159						161						204																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
	SacI+CC		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC		SacI+CG		SacI+CT		SacI+CC

Tableau 4.5 : sélection des conditions AFLP 4-bases sélectives pour l'amplification des marqueurs candidats sur plusieurs souches de *X. perforans* et *X. euvesicatoria*

^a : marqueur candidat (pb)

D'autre part, comme il existe une grande similarité génétique entre *X. euvesicatoria* et *X. perforans*, il nous a semblé intéressant de comparer les résultats de séquençage obtenus, avec ceux prédits pour *X. euvesicatoria*. Nous disposons en effet de la séquence du génome complet de *X. euvesicatoria* (Thieme *et al.*, 2005)). A l'aide de l'application « *In silico* AFLP-PCR amplification » (<http://insilico.ehu.es/AFLP/>) nous avons mimé *in silico* des AFLPs sur le génome de *X. euvesicatoria* dans les mêmes conditions sélectives que les AFLP réalisées expérimentalement. Nous avons comparé la nature des fragments prédits par ce logiciel avec celle des fragments récupérés et séquencés (Tableau 4.6).

Pour chaque fragment étudié, on retrouve sur l'ensemble des clones les séquences prédites par le logiciel pour *X. euvesicatoria*. Par exemple, dans le cas du fragment attendu de 147 pb pour la condition sélective *SacI* CT/*MspI* TG, on obtient 7 clones sur 8 contenant la séquence attendue codant pour la protéine GumB (la différence de taille est due à la taille des amorces qui est déduite *in silico*). Le huitième clone renferme une séquence de même taille (147 pb) mais non homologue à *gumB*. Par ailleurs, cette séquence n'est pas prédite pour *X. euvesicatoria* dans les conditions AFLP données. Elle est probablement en partie spécifique à *X. perforans*. Ce cas illustre bien le phénomène de co-migration de différents produits d'amplification non homologues. Ce phénomène est bien connu en AFLP, il est plus fréquent dans le cas des petits fragments qui sont plus nombreux (Brugmans *et al.*, 2003; Meksem *et al.*, 2001).

Aussi, dans le cas de l'amplification sélective *SacI*+CA/*MspI*+TC, en plus du fragment attendu à la taille 161 pb, on a isolé un fragment de 164 pb également prédit par le logiciel mais qui n'était pas considéré comme spécifique de *X. euvesicatoria* d'après notre crible. Ce cas illustre plutôt un problème de contamination du fragment candidat avec de l'ADN d'un fragment très proche pendant la phase de récupération des bandes sur le gel.

Pour les marqueurs que nous n'avons pas encore isolés et séquencés, nous avons utilisé l'outil AFLP *in silico* pour voir si des fragments de la taille attendue au séquenceur se retrouvaient prédits par le logiciel dans les conditions AFLP utilisées (Tableau 4.6).

Dans le cas du fragment de 102 pb, la condition AFLP générant *in silico* la taille la plus proche est la condition *SacI*+CC *MspI*+TA, avec amplification d'un fragment de 103 pb (soit 78 pb sans les amorces). La condition *SacI*+CT *MspI*+TC génère un fragment de 97 pb (soit 73 pb sans les amorces) et aucun fragment de la taille attendue n'est prédit avec la condition *SacI*+CC *MspI*+TC. Ces résultats viennent corroborer en partie ceux obtenus au séquenceur,

avec la condition *SacI*+CC *MspI*+TA comme étant la plus probablement impliquée dans l'amplification du fragment spécifique de 102 pb. Dans le cas de la condition *SacI*+CT *MspI*+TA, nous avons vérifié la présence du fragment de 97 pb pour la majorité des souches étudiées. L'absence de prédiction du fragment de 102 pb chez la souche séquencée peut s'expliquer par une mutation au niveau d'un des deux sites de restriction dans cette souche.

Dans le cas des fragments de 109 pb, 113 pb et 204 pb nous retrouvons pour chacun une prédiction compatible aux tailles attendues, et ces résultats sont également en accord avec les résultats obtenus au séquenceur concernant les conditions les plus probables.

Une comparaison de séquence (blastn) a été réalisée sous NCBI sur les séquences d'ADN (dans le cas d'une région codante, séquence du gène entier dans lequel se trouve le fragment AFLP) pour voir leur potentiel en terme de spécificité. Deux séquences se sont montrées intéressantes, celle codant pour une protéine hypothétique qui ne présente pas d'homologie avec d'autres *Xanthomonas* sur 40% de la séquence totale, et celle codant pour une acétyltransférase (XCV1973) qui ne présente aucune homologie avec d'autres *Xanthomonas* (Tableau 4.6).

Taxonomie et diagnostic des *Xanthomonas* de la gale bactérienne des Solanées

Conditions AFLP	taille attendue	taille obtenue	nbre de souches analysées	nbre de clones séquencés	Blastn	prédiction AFLP <i>in silico</i>
<i>sacI</i> +CT <i>MspI</i> +TG	147 pb (123 bp sans les amorces)	147 pb	2	8	7 cl. : 147 pb 100% identité avec xanthan biosynthesis polysaccharide export protein GumB chez <i>X.euvesicatoria</i> , également très conservé chez <i>X.citri</i> pv. <i>citri</i> et <i>X.oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> 1 cl. : 147pb 98%identité sur 80% sequence avec une putative export protein chez <i>X. euvesicatoria</i> , et très conservé chez divers <i>Xanthomonas</i> 3 cl. : 159pb 97% identité sur méthylase of chemotaxis methyl-accepting proteins chez <i>X.</i> <i>euvesicatoria</i> et <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>citri</i> 1 cl. : 156 pb 99% identité avec GTP-binding protein <i>X. euvesicatoria</i> . conservé chez divers <i>Xanthomonas</i> 4 cl.: 164pb 99% et 95% identité avec transcriptional regulator, MerR family respectivement chez <i>X. euvesicatoria</i> et <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> 2 cl.: 161 pb 100% identité avec putative competence lipoprotein <i>X. euvesicatoria</i> et conservé chez divers <i>Xanthomonas</i> et <i>X. citri</i> pv. <i>citri</i> 4 cl. 99 % identité avec conserved hypothetical protein chez <i>X. axonopodis</i> pv <i>vesicatoria</i> (Xcv 1973) et 89% avec HP chez <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> (XCC ₁₀₀ 2190)	123 pb : xanthan biosynthesis polysaccharide export protein GumB
<i>sacI</i> +CT <i>MspI</i> +TG	159 pb (135 bp sans les amorces)	156/159 pb	2	4		135 pb : méthylase of chemotaxis methyl- accepting proteins
<i>sacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	161 pb (137 bp sans les amorces)	161/164 pb	2	6		137 pb : putative competence lipoprotein
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +GT	319 pb (295 bp sans les amorces)	319 pb	2	4		295 pb : conserved hypothetical protein Xcv 1973
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TA <i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TC	102 pb 109 pb					78 pb : XCV3220 hypothetical protein 85 pb : séquence intergénique 93 pb : XCVd0126 putative membrane- associated acetyltransferase 181 pb : XCV3699 alkB DNA repair system specific for alkylated DNA 78 pb : XCV1973 hypothetical protein 281 pb : XCV0365 hypothetical protein
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TG <i>sacI</i> +CA <i>MspI</i> +TT	113 pb 204 pb					
<i>sacI</i> +CT <i>MspI</i> +GC <i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +CA	102 pb 305 pb					

Tableau 4.6 : comparaison entre fragments AFLP prédits *in silico* (logiciel *In silico* AFLP-PCR amplification) et fragments récupérés après migration des produits AFLP sur gel de polyacrylamide.

Par la suite nous n'avons pas poursuivi ce travail car nous nous sommes consacrés à la recherche de marqueurs spécifiques de *X. perforans*. Néanmoins il serait intéressant de sélectionner des amorces dans ces deux séquences candidates et de les tester sur une collection de souches de *X. perforans* et *X. euvesicatoria* ainsi que de souches non cibles.

X. perforans : recherche de marqueurs privés

Nous avons criblé au séquenceur les fragments spécifiques sur 11 souches de *X. perforans* et 6 souches de *X. euvesicatoria* et cette fois-ci nous avons sélectionné l'ensemble des fragments amplifiés pour la majorité des souches de *X. perforans* et non amplifiés chez *X. euvesicatoria*. Nous avons sélectionné certains fragments, même dans le cas où ils n'étaient pas repérés dans les conditions AFLP 2 bases sélectives. En effet, dans le cas de *X. gardneri* que nous étudierons ci-après, puis au fur et à mesure de nos expérimentations, nous avons mis en évidence la présence de fragments nouvellement amplifiés en conditions 4 bases sélectives, qui n'apparaissaient pas dans les profils obtenus avec 2 bases sélectives, et principalement des fragments de grandes tailles.

Les résultats sont présentés Tableau 4.7 .

Conditions AFLP	taille fragment amplifié	nombre de souches amplifiées ^a	taille obtenue au séquençage	nombre de souches ^b	nombre de fragments ^c	Blastn
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +GT	217	10 / 0	217	2	4	99 % identité avec TonB-dépendent outer membrane receptor chez <i>X. axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i> et très conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +GT	309	9 / 0	309	1	2	87% identité avec conserved hypothetical protein chez <i>X. axonopodis</i> pv <i>citri</i>
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TC	356	8 / 0	356	2	4	95% identité avec VirB4 protein chez <i>X. axonopodis</i> pv <i>citri</i> et conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +AG	325	8 / 0	327	2	4	3 clones : 75 % identité sur 40% de la séquence avec pre-pilin leader sequence chez <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1 clone: pas d'homologie en blastn (en blastx, 32% identité avec Tfp pilus assembly protein Pila de <i>Acinetobacter baumannii</i> et 35% sur 81 à 89% % de la séquence avec fimbriin chez différents <i>Xanthomonas</i>)
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TC	168	9 / 0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	227	9 / 0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TT	388	10 / 0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TC	455	8 / 0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +AG	180	8 / 0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +AC	206	8 / 0				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +AG	325	8 / 0				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +GT	103	8 / 0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +GC	187	8 / 0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +GC	236	9 / 0				
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +CC	265	8 / 0				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +CA	279	9 / 0				

Tableau 4.7 : nature des fragments d'ADN récupérés sur gel de polyacrylamide pour *X. perforans*

^a nombre de souches de *X. perforans* amplifiées sur 11 / nombre de souches de *X. euvesicatoria* amplifiées sur 6 ; ^b nombre de souches pour lesquelles le fragment a été récupéré sur gel ; ^c nombre de fragments clonés (en général 2 clones par souche) ; ^d vérification à posteriori

Ils montrent la présence d'un certain nombre de séquences candidates :

- Une séquence de 309 pb montrant seulement 87% identité avec une protéine hypothétique chez *X. citri* pv. *citri* (désigné ci-après fragment 1).
- Une séquence de 327 pb montrant sur 40% de sa longueur, seulement 75% d'identité avec une séquence leader codant la pre-pilin chez *X. campestris* pv. *campestris* (désigné ci-après fragment 2).
- En isolant et clonant le fragment de 327 pb chez différentes souches, un fragment de 221 pb codant une protéine ayant de l'homologie avec une protéine d'assemblage du pili chez *Acinetobacter baumannii* a également été cloné. En regardant à *posteriori* les profils obtenus au séquenceur, il existait en effet une amplification de fragments de cette taille, pour 6 souches de *X. perforans* (désigné ci-après fragment 3).

Nous avons également isolé un fragment de 217 pb dont la séquence possède 99% d'identité avec un recepneur TonB-dépendent chez *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*. Or ce fragment était prédit comme spécifique à *X. perforans* en conditions 2 bases sélectives. Ce résultat a été confirmé pour la condition 4 bases sélectives *SacI*+CG *MspI*+GT pour toutes les souches de *X. perforans* et aucune souche de *X. euvesicatoria*. Nous avons cherché à éclaircir le résultat obtenu pour ce fragment dans le but d'évaluer notre crible par la méthode AFLP. L'analyse de la séquence homologue de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* séquence révèle qu'elle possède en fait une seule mutation par rapport à la séquence de *X. perforans*, qui se trouve au niveau du site *SacI*.

Il est à noter que plusieurs marqueurs candidats restent encore à exploiter, c'est le cas également pour *X. gardneri*, comme nous le verrons par la suite.

Nous avons sélectionné plusieurs paires d'amorces pour les trois fragments d'ADN candidats, et les avons testées sur la collection de souches cibles et non cibles. Dans le cas du fragment 1, nous avons choisi plusieurs paires d'amorces au niveau des régions les moins homologues entre *X. citri* et *X. perforans*.

Concernant l'inclusivité, les résultats obtenus pour les fragments 1 et 2 sont excellents, toutes les souches cibles sont amplifiées par l'ensemble des amorces : on obtient des amplicons de 257 pb et 166 pb respectivement avec les amorces 8U/246L et 6U/192L et des amplicons de 232 pb et 178 pb respectivement pour les amorces 54U/267L19 et 109U/267L20 pour le fragment 2 (Figure 4.3 et Tableau 4.2a).

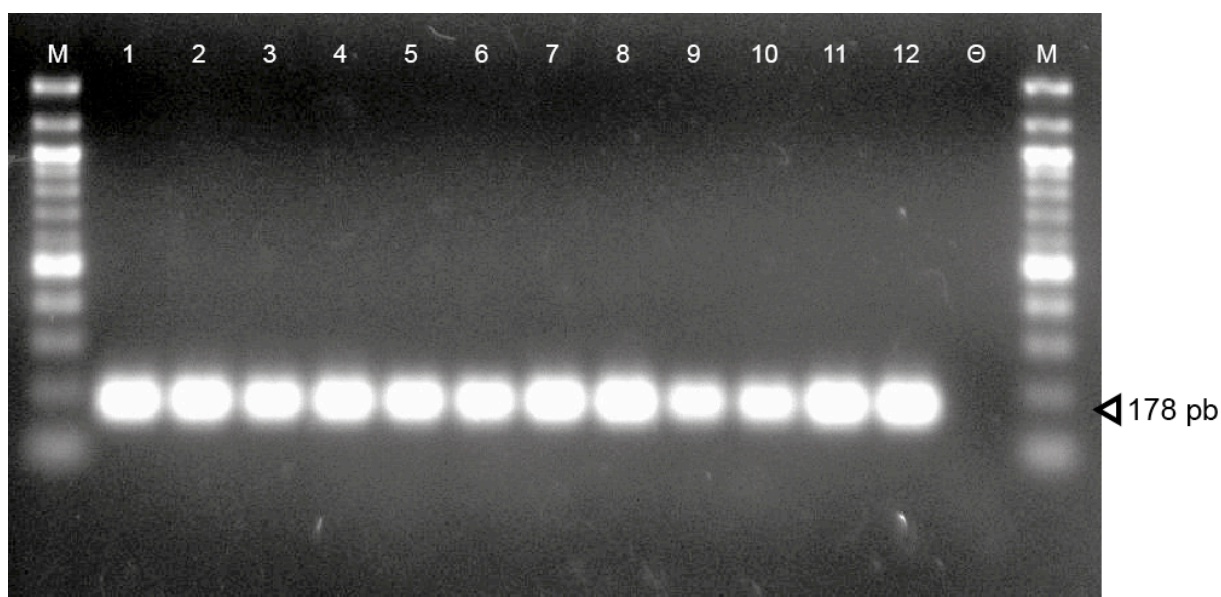


Figure 4.3 : amplification de l'ensemble des souches de *X. perforans* à l'aide des amorces 109U/267L20 de 1 à 12 : LB273-2, LB273-3, LB273-4, LB101-1, LB101-2, LB102-2, LB103-1, LB103-2, LB103-3, NCPPB4321, LH3 et LB273-1. M : Marqueur de taille (100pb) Θ : témoin négatif

Pour le fragment 3, deux souches cibles ne sont pas amplifiées avec les amorces 62U/160L, ce qui corrobore les résultats obtenus au séquenceur (seulement 6 souches de *X. perforans* présentaient une amplification) (Tableau 4.2a). Nous n'avons pas retenu ce fragment pour le développement de la PCR.

Pour l'exclusivité, les résultats sont assez bons, avec quand même dans tous les cas, quelques souches non cibles qui sont amplifiées (Tableau 4.2b) :

Pour le fragment 1 : Les deux paires d'amorces 8U/246L et 6U/192L souches non cibles génèrent une légère amplification à la taille attendue pour 3 souches du groupe 9.2 (souches appartenant respectivement aux pathovars *cassiae*, *desmodiigancetici* et *phyllanthi*) ainsi qu'une souche apparentée à *X. perforans* mais non pathogène sur tomate et piment (LMG 904).

Pour le fragment 2 : un très léger signal à la taille attendue est obtenu pour trois souches appartenant à *X. axonopodis* pv. *begoniae*, LMG 551, LMG7303 et CFBP2524 avec la paire d'amorces 54U/267L19, par contre la souche LMG 904 n'est pas amplifiée. Le même résultat est obtenu avec la paire d'amorces 109U/267L20, excepté que les signaux sont moins forts, et que la souche LMG 551 n'est pas amplifiée.

En augmentant la température d'hybridation (de 63°C à 65°C), nous n'avons plus de réponse pour les souches non cibles avec cette dernière paire d'amorces.

Nous avons donc sélectionné cette paire d'amorces 109U/267L20 pour la PCR spécifique de *X. perforans*.

b. Xanthomonas gardneri

Nous avons testé les 64 conditions AFLP en 4 bases sélectives sur deux souches de *X. gardneri*. Comme pour *X. perforans*, des résultats parfois ambigus ont été mis en évidence, avec plusieurs conditions amplifiant le fragment de taille attendu, ce qui témoigne de la présence de plusieurs fragments de taille identique ou proche dans les profils AFLP en 2 bases sélectives. Chaque condition donnant une amplification de la taille attendue ou proche pour les deux souches, a été à nouveau testée par électrophorèse capillaire, cette fois ci sur 16 souches de *X. gardneri*.

Les conditions dans lesquelles au moins 15 souches montraient une amplification de la taille attendue ont été retenues. Pour certaines de ces conditions, les extraits ont été passés sur gel de polyacrylamide pour extraction du fragment désiré suivi de son clonage et séquençage.

Le Tableau 4.8 récapitule les résultats obtenus. Un certain nombre de remarques découlent de ces données :

Même si ce n'est pas la majorité des cas, un certain nombre de fragments obtenus après séquençage ne présentent pas la taille attendue. Cela résulte probablement d'une mauvaise estimation de la taille des fragments sur le gel de polyacrylamide.

On retrouve le phénomène de co-migration dans un cas pour lequel on a isolé un fragment de taille identique mais de nature différente (fragment de 133 pb).

Parmi les fragments de taille attendue et exploitables, il n'y a pas vraiment de séquence candidate, les séquences sont très conservées parmi les *Xanthomonas* (91-98% identité).

Le fragment de 156 pb n'était pas prédit comme fragment spécifique à *X. gardneri* en condition 2 bases sélectives. Cependant, sur gel de polyacrylamide, toutes les souches testées montraient une bonne amplification pour ce fragment. En regardant *a posteriori* les données d'électrophorèse capillaire, nous avons observé des pics d'amplification pour 14/16 des souches testées. Ce fragment a été séquencé pour les deux souches JQ725 et NCPPB881. Identique pour les deux souches, cette séquence correspond à une région intergénique dont

seule une partie présente de l'homologie avec d'autres *Xanthomonas* (82% identité avec *X. citri* pv. *citri* sur 64% de la séquence).

Conditions AFLP	taille fragment amplifié	nombre de souches amplifiées ^a	taille obtenue au séquençage	nombre de souches ^b	nombre de fragments ^c	Blastn
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TT	106	15	107	2	4	96% identité avec un Mg ⁺⁺ transporter chez <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> et très conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	132	15	133	2	4	3 clones: 95% identité avec oxoglutarate deshydrogenase chez chez <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> et très conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i> 1 clone : 89% identité avec ATP sulfurylase chez <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> et conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TC	328	15	330	2	2	98% identité avec <i>Xanthomonas gardneri</i> strain GA2(D) XpoD-like gene. Conservé chez divers <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TG	156	14 ^d	156	2	4	région intergénique 82% identité avec <i>X.citri</i> pv citri sur 64% de la séquence
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TT	149	15	150	2	4	91% identité avec UDPglucose 4-epimerase de <i>X. euvesicatoria</i> et conservé chez divers <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TG	159	15	158			95% identité avec ABC transporter ATP-binding protein de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> et conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CA <i>MspI</i> +TA	163	16	141	2	4	85% identité avec un transcriptional regulator chez <i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i> et conservé chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TT	368	16	373	2	4	1 seule sequence exploitable, pour 64% de séquence, identité avec integrase de divers bactéries gram - et fragment de phage <i>Xanthomonas</i> en 5'
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +TA	164	16	271	1	3	89% identité avec une hypothetical protein chez <i>X. euvesicatoria</i> et conservée chez d'autres <i>Xanthomonas</i>
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +TG	132	16				
<i>SacI</i> +CT <i>MspI</i> +TT	149	16				
<i>SacI</i> +CG <i>MspI</i> +AT	114	15				
<i>SacI</i> +CC <i>MspI</i> +AC	156	15				

Tableau 4.8 : nature des fragments d'ADN récupérés sur gel de polyacrylamide pour *X. gardneri*

^a nombre de souches amplifiées sur 16 souches testées ; ^b nombre de souches pour lesquelles le fragment a été récupéré sur gel ; ^c nombre de fragments clonés (en général 2 clones par souche) ; ^d vérification à posteriori

D'après les séquences obtenues, nous avons sélectionné plusieurs paires d'amorces, dont une de chaque couple était située dans la région spécifique à *X. gardneri*. Une paire d'amorces (1726U/1675L) a permis l'amplification de l'ensemble des souches de *X. gardneri* excepté la souche ICMP 7383.

En nous référant aux séquences complètes des génomes de *X. citri* pv. *citri* et *X. euvesicatoria*, nous avons vu que cette zone intergénique se trouvait encadrée en 5' par une séquence codant une protéine hypothétique très conservée et en 3' par une séquence très conservée également codant une serine hydroxymethyltransferase (Figure 4.4). Nous avons dessiné des amorces dans ces deux gènes d'après la séquence de *X. citri* pv. *citri* pour amplifier la région intergénique de la souche ICMP7383 (amorces 2138U/2299L).

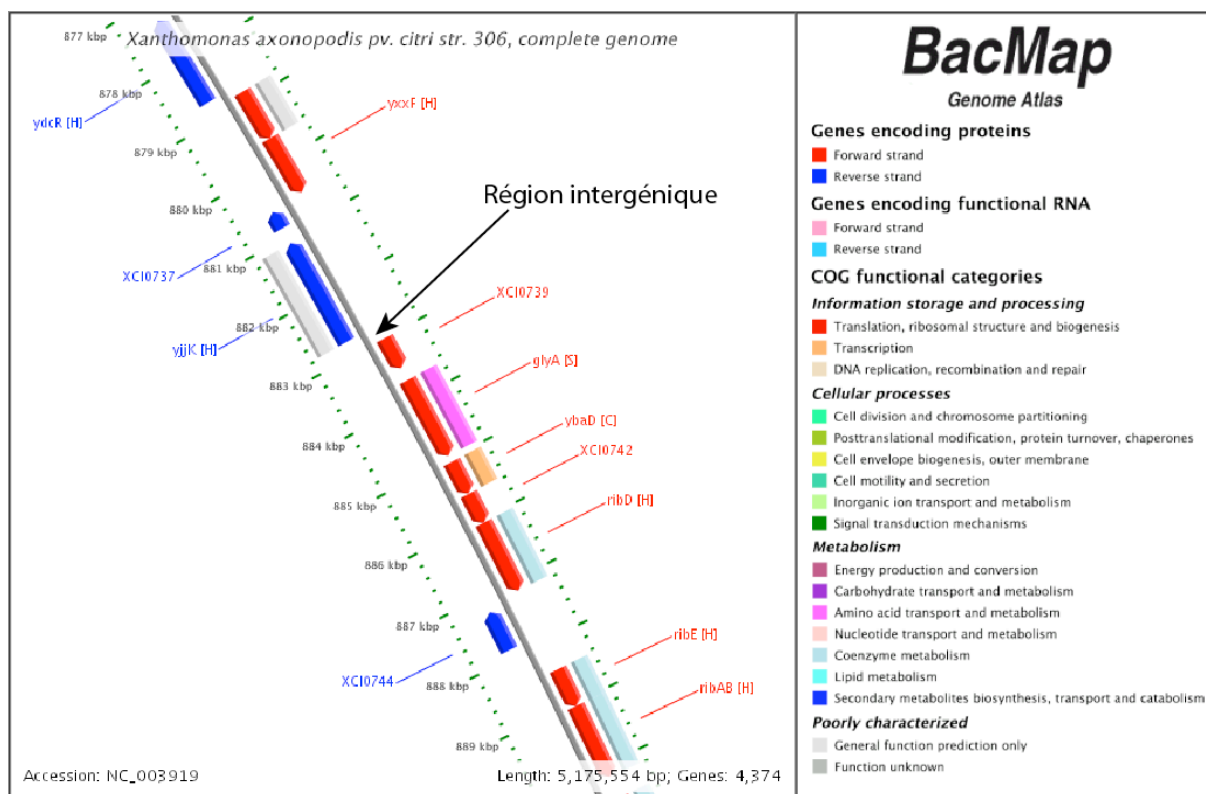


Figure 4.4 : région intergénique ciblée dans la PCR spécifique développée pour *X. gardneri*.

En alignant les séquences obtenues pour les souches de *X. gardneri* avec la séquence disponible pour la souche de *X. citri* pv. *citri*, nous avons dessiné différents systèmes d'amorces pour amplifier spécifiquement *X. gardneri* (Figure 4.5). La paire d'amorces 7383-1U/2299L amplifie toutes les souches cibles incluant la souche ICMP7383 (Figure 4.6). Les souches de l'espèce synonyme *X. cynarae* sont également amplifiées. Parmi toutes les souches non cibles, seule une souche de *X. hortorum* pv. *hederiae* est amplifiée. Or, comme

nous l'avons vu au chapitre précédent, l'espèce *X. hortorum* est phylogénétiquement très proche de l'espèce *gardneri/cynarae*.

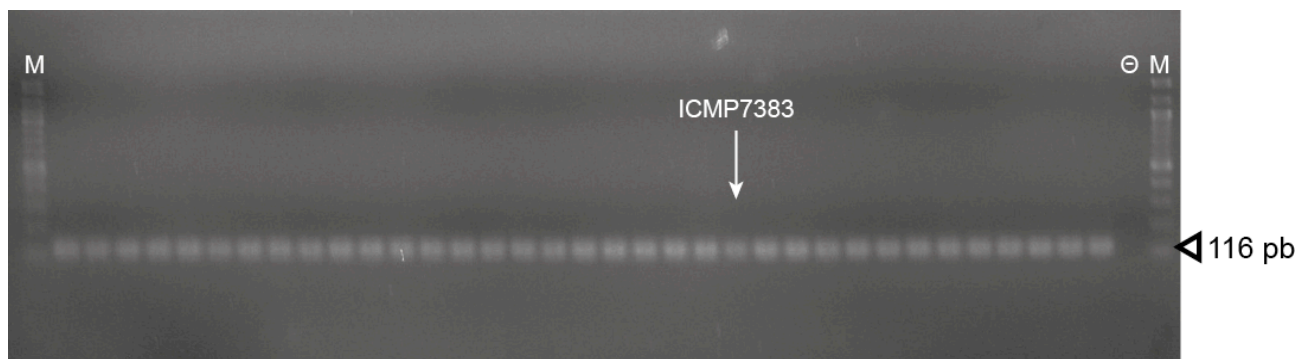


Figure 4.6 : amplification de l'ensemble des souches de *X. gardneri* à l'aide des amorces 7383-1U/ 2299L.
M : 100 pb.

Nous avons séquencé la région intergénique pour une souche de *X. cynarae* et une souche de *X. hortorum* pv. *hederae*, amplifiée à l'aide des amorces 2138U/2299L. La Figure 4.7 montre l'alignement des différentes séquences obtenues.

Alors que la séquence de *X. cynarae* est identique à celle des deux souches de *X. gardneri*, la séquence de la souche de *X. hortorum* pv. *hederae* présente clairement des signatures de séquence.

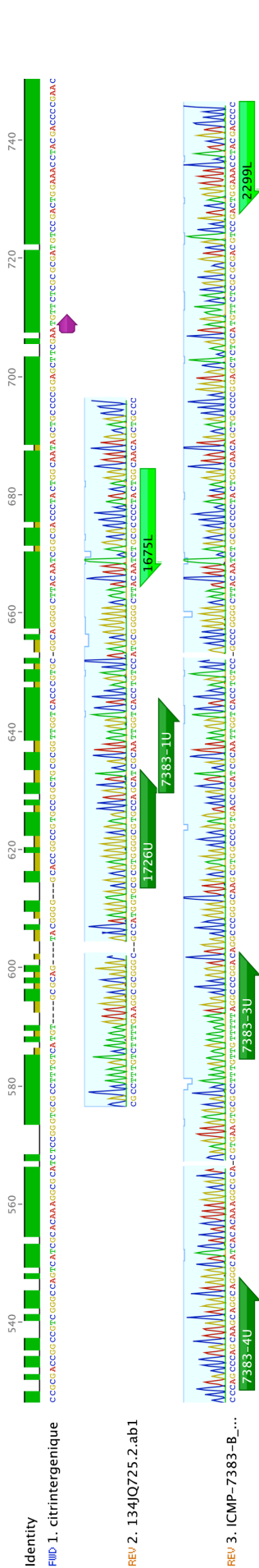


Figure 4.5 : désignation de différentes amorces sur l'alignement de séquences de *X. citri* pv. citri (306) et *X. gardneri* (souches IQ725 et ICMP 7383).

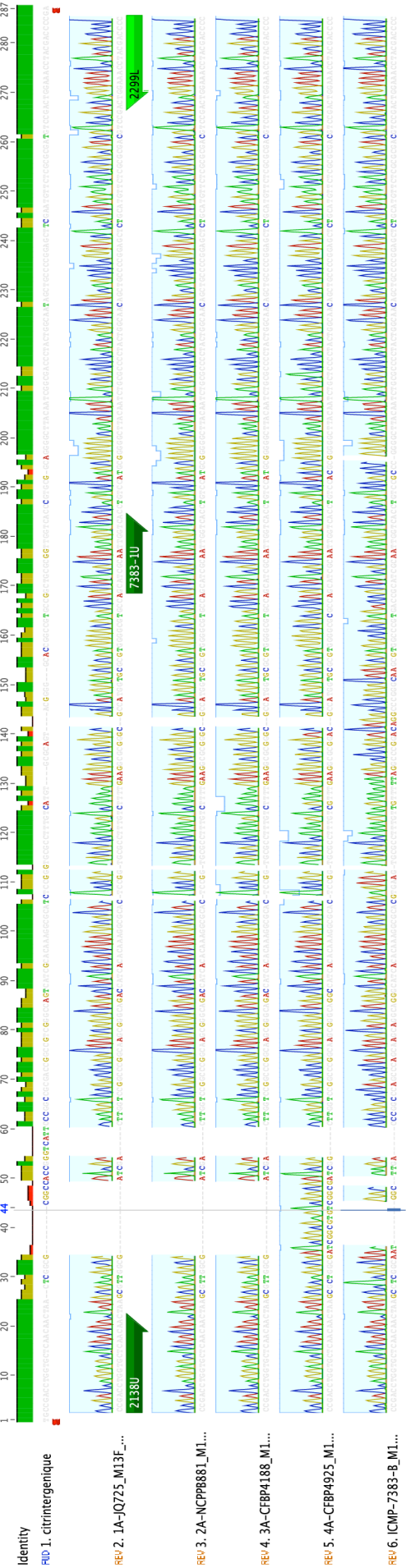


Figure 4.7 : alignement des différentes séquences de la zone intergénique obtenues pour 306 (*X. citri* pv. citri), IQ725, NCPB881 et ICMP7383 (*X. gardneri*), CFBP4188 (*X. cynarae*) et *X. horiorum* (CFBP4925)

4. Conclusion

4.1. Un nouveau protocole de diagnostic de la gale bactérienne

Nous sommes en mesure de proposer un protocole PCR pour l'identification des quatre espèces bactériennes associées à la gale bactérienne de la tomate :

Il comprend les deux paires d'amorces publiées pour l'amplification des espèces *X. euvesicatoria* et *X. vesicatoria* (Koenraadt *et al.*, 2009) ainsi que les paires d'amorces nouvellement dessinées pour les espèces *X. gardneri* et *X. perforans*, à partir des marqueurs AFLP (protocoles fournis dans la partie méthodologie). Ce protocole est résumé Figure 4.8.

Des essais de multiplexage de ces paires d'amorces sont en cours afin de diminuer le nombre de réaction PCR nécessaire au diagnostic de cette maladie.

*PCR X. euvesicatoria (taille attendue 173pb)			
Réactifs	Conc. stock	Conc. tube	1 tube (µl)
eau ultrapure			17
Tampon	10x	1x	2,5
MgCl ₂	25mM	3 mM	2
dNTPs (mix)	10mM	100µM de chaque	0,25
amorce Bs-XeF	5µM	0,2µM	1
amorce Bs-XeR	5µM	0,2µM	1
Taq polymerase RedGoldStar, eurogentec)	5U/µl	1,25U	0,25
ADN (5-10 ng/µl)			1
Total			25

95°C 5 '

94°C 30s

53°C 30s

72°C 40s

72°C 7 '

30 cycles

*PCR X. vesicatoria (138pb)			
Réactifs	Conc. stock	Conc. tube	1 tube (µl)
eau ultrapure			17
Tampon	10x	1x	2,5
MgCl₂	25mM	3 mM	2
dNTPs (mix)	10mM	100µM de chaque	0,25
amorce Bs-XvF	5µM	0,2µM	1
maorce Bs-XvR	5µM	0,2µM	1
Taq polymerase RedGoldStar, eurogentec)	5U/µl	1,25U	0,25
ADN (5-10 ng/µl)			1
Total			25

95°C 5 '

94°C 30s

54°C 30s

72°C 40s

72°C 7 '

30 cycles

PCR X. gardneri 7383-1U/2299L (116pb)			
Réactifs	Conc. stock	Conc. tube	1 tube (µl)
eau ultrapure			17
Tampon	10x	1x	2,5
MgCl₂	25mM	2 mM	2
dNTPs (mix)	10mM	100µM de chaque	0,25
amorce 7383-1U	5µM	0,2µM	1
amorce 2299L	5µM	0,2µM	1
Taq polymerase RedGoldStar, eurogentec)	5U/µl	1,25U	0,25
ADN (5-10 ng/µl)			1
Total			25

95°C 5 '

94°C 30s

62°C 30s

72°C 40s

72°C 7 '

30 cycles

PCR X. perforans 109U/267L20 (178pb)			
Réactifs	Conc. stock	Conc. tube	1 tube (µl)
eau ultrapure			17
Tampon	10x	1x	2,5
MgCl₂	25mM	2 mM	2
dNTPs (mix)	10mM	100µM de chaque	0,25
amorce 54U	5µM	0,2µM	1
amorce+A44 267L19	5µM	0,2µM	1
Taq polymerase RedGoldStar, eurogentec)	5U/µl	1,25U	0,25
ADN (5-10 ng/µl)			1
Total			25

95°C 5 '

94°C 30s

65°C 30s

72°C 40s

72°C 7 '

30 cycles

| *protocole mis au point avec amorces issues de Koenraadt H et al. II International Symposium on Tomato Diseases, n° 73, vol1, 2009. | | | |

Figure 4.8 : protocoles PCR pour détecter les *Xanthomonas* spp. responsables de la gale bactérienne des Solanées à graines

4.2. Quelle spécificité?

Ce protocole distingue *X. euvesicatoria* et *X. perforans* en dépit de la probable synonymie de ces deux espèces suggérée par nos travaux et par des publications antérieures (Parkinson *et al.*, 2007; Parkinson *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2008). Nous avons tenu à développer en priorité un outil distinguant ces deux espèces, car ces deux groupes de souches possèdent des profils pathogéniques différents, et il est important de pouvoir les différencier. Néanmoins nous avons également mis à jour des marqueurs communs à ces deux espèces, et un outil complémentaire pourra ultérieurement être développé.

À l'inverse, dans ce protocole, *X. gardneri* n'est pas directement différenciable de *X. cynarae* et de *X. hortorum*.

Concernant *X. cynarae*, ce résultat n'est pas étonnant, puisque nous avons montré au deuxième chapitre que les souches de cette espèce étaient génétiquement très proches des souches de *X. gardneri* et qu'elles possédaient le même profil pathologique sur les espèces végétales testées (pathogènes sur piment, tomate et artichaut). Les analyses AFLP précédentes ont également montré que la souche ICMP7383 était génétiquement plus éloignée de *X. gardneri* que ne le sont les souches de *X. cynarae*. Il n'est donc pas étonnant que les souches de *X. cynarae* répondent positivement au test PCR si c'est le cas pour ICMP7383.

Le résultat pour *X. hortorum* n'est pas surprenant puisque nous avons également montré, comme d'autres auteurs (Young *et al.*, 2008), que *X. hortorum* était aussi génétiquement liée à *X. gardneri* mais à un moindre niveau que *X. cynarae*. Par contre, cette espèce est inféodée à des familles botaniques différentes des espèces-hôtes de *X. gardneri/X. cynarae*. En effet, une assez grande diversité intraspécifique a été mise en évidence au sein de *X. hortorum* (Young *et al.*, 2008) et cette espèce comprend plusieurs pathovars retrouvés sur des genres botaniques variés : *Lactuca*, *Hedera*, *Pelargonium*, *Taraxacum* et *Daucus*. Au vu de ces données, il semble très peu probable de retrouver *X. hortorum* sur Solanées à graines. Néanmoins, en cas de doute sur une souche, on a la possibilité de séquencer l'amplicon obtenu pour y chercher la signature *X. hortorum*.

On peut également utiliser en parallèle la PCR proposée par Koenraadt *et al.* en gardant bien en mémoire qu'elle peut générer des faux-négatifs (Koenraadt *et al.*, 2009).

Concernant le protocole PCR *X. euvesicatoria* basé sur les amorces Koenraadt, nous avons vu qu'il était très spécifique hormis une souche (LMG8019) appartenant à *X. alfalfae* pv. *alfalfae*

qui présente un amplicon à la taille attendue. Ce résultat n'est pas étonnant au vu de la proximité génétique de ces deux taxons. Il faudrait néanmoins vérifier cela sur un plus grand nombre de souches puisque l'autre souche de *X. alfalfae* pv. *alfalfae* testée (LMG497) est négative. Il faudrait également séquencer les amplicons pour voir s'il existe des signatures différenciant les deux taxons. Encore une fois, on peut également considérer que les chances de rencontrer *X. alfalfae* (inféodé à la luzerne) sur Solanées est très faible. Il n'existe à notre connaissance aucune description de cette espèce sur cette famille végétale, et nous avons montré au chapitre 3 que la souche type inoculée n'était pas pathogène sur tomate et piment. Il faudrait néanmoins réaliser des inoculations sur Solanées avec la souche LMG8019.

Nous n'avons pas pris en compte *X. campestris* pv. *raphani* dans la mise au point d'un protocole de diagnostic de la gale bactérienne car c'est une espèce pathogène des Brassicacées et sa présence sur Solanées semble anecdotique. Néanmoins, en l'absence de réponse positive au protocole proposé plus haut, il sera intéressant de rechercher la présence de ce pathogène. Il n'existe à notre connaissance aucun test PCR spécifique de *X. campestris* pv. *raphani*. Néanmoins, cette espèce a été prise en compte dans la mise au point de tests PCR dédiés à la détection sur semences de *Brassica* des pathovars de *X. campestris* (Berg *et al.*, 2005, 2006). *X. campestris* pv. *raphani* répond positivement au test PCR, la même manière que les autres pathovars de *campestris*. Comme à priori, seul ce pathovar de *X. campestris* associé aux Brassicacées est associé aux Solanées à graines, on pourrait utiliser ces tests pour la détection spécifique de *X. campestris* pv. *raphani* sur tomate et piment/poivron.

4.3. Evaluation de la méthode AFLP pour la sélection de marqueurs spécifiques

Nous avons abouti à un résultat positif pour les deux types de marqueurs recherchés, ce qui est en soi un très bon critère de réussite pour la démarche utilisée.

Le travail réalisé sur les marqueurs communs à *X. perforans* et *X. euvesicatoria* nous a permis de valider la démarche générale en montrant qu'il y avait globalement une adéquation entre les résultats de génotypage AFLP, ceux obtenus après séquençage des fragments et ceux prédits par le logiciel d'AFLP *in silico*. Cette comparaison a pu être menée avec des séquences extraites de souches de *X. perforans* car il existe une grande similitude génétique entre les génomes de *X. perforans* et *X. euvesicatoria*.

Notre démarche s'appuie sur des différences entre séquences basées sur du polymorphisme de restriction. On peut imaginer que ce polymorphisme va se révéler d'autant plus que les

séquences en jeu ne seront pas homologues. Néanmoins, comme nous l'avons vu dans de nombreux cas, ce polymorphisme de restriction se retrouve souvent pour des séquences très conservées, et nous avons même rencontré un cas pour *X. perforans* (marqueur privé de 217 pb), où une seule base différait entre la séquence de *X. perforans* et *X. euvesicatoria*, et cela au niveau du site de restriction. Ces résultats montrent qu'on peut avoir à cribler un certain nombre de marqueurs avant de trouver des séquences spécifiques.

De ce travail peuvent être tirées quelques règles à suivre pour optimiser la méthode :

Afin de réduire le phénomène de co-migration d'amplicons, il est souhaitable d'analyser des fragments aussi grands que possible car ils sont moins nombreux que les petits fragments. Pour repérer ce phénomène, il est également important d'analyser plusieurs clones pour chaque souche.

Afin d'éviter les problèmes de contamination ADN au cours de l'extraction des fragments du gel, il est conseillé de choisir des fragments présentant des pics d'amplification importants, car ils sont plus faciles à repérer et donc à extraire.

Ces expérimentations ont également montré que l'on peut avoir amplification de certains fragments en conditions 4-bases sélectives, qui n'apparaissent pas en conditions 2-bases sélectives. En conditions 2-bases sélectives, nous avons en théorie 16 fois plus de bandes amplifiées qu'en conditions 4-bases sélectives. Une explication serait qu'en AFLP 2-bases sélectives, on a une compétition pour l'amplification de certains de ces fragments (en particulier ceux de grande taille), qui n'existe pas quand on se trouve dans des conditions de moindre amplification, comme celles de l'AFLP-4 bases sélectives.

D'une manière générale, cette méthode est utile pour rechercher des fragments spécifiques quand on n'a aucune donnée de séquences. Elle a d'ailleurs déjà été utilisée pour la recherche de marqueurs spécifiques chez différents organismes nuisibles, comme le nématode *Ditylenchus dipsaci* (Esquibet *et al.*, 2003), le champignon *Verticillium albo-atrum* (Radisek *et al.*, 2004) ou encore la bactérie *X. axonopodis* pv. *allii* (Robène-Soustrade *et al.*, 2010). Comparée à la technique RAPD, plus largement utilisée aux mêmes fins (Meng *et al.*, 2004; Robène-Soustrade *et al.*, 2006; Trébaol *et al.*, 2000), elle est plus lourde à mettre en œuvre, mais elle génère en quelques réactions un nombre de marqueurs plus importants. Ce type de méthode devrait néanmoins être progressivement abandonné à l'avenir du fait du nombre croissant de séquences de génomes bactériens disponibles (voir introduction bibliographique). En effet, parmi les nombreuses applications que l'on peut envisager à partir de ces génomes

complets, se trouve le diagnostic, avec la mise en évidence *in silico* de marqueurs potentiels par comparaison et hybridation soustractive *in silico* des différents génomes entre eux (Lang *et al.*, 2010). De même, la technique des puces à ADN présente un potentiel vraiment intéressant pour repérer des marqueurs privés à certains groupes bactériens en permettant de cribler un nombre important de souches. Il faut néanmoins posséder les séquences génomiques complètes des représentants de ces groupes afin de la mettre en œuvre.

Chapitre V :

Discussion générale

Chapitre V : Discussion générale

Les objectifs principaux des travaux développés dans cette thèse étaient d'une part, l'évaluation de deux techniques moléculaires, l'AFLP et la MLSA pour l'analyse de la diversité génétique des *Xanthomonas* spp. pathogènes des Solanées et leur application pour décrire la diversité existante dans les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien et, d'autre part, la mise au point d'un outil d'identification rapide qui prenne en compte la diversité des agents pathogènes associés à la maladie.

Quand ce travail a été initié, très peu de données étaient disponibles sur le pathosystème *Xanthomonas*/Solanées dans la région Océan Indien. Une seule publication (Bouzar *et al.*, 1994b) avait mentionné la présence de *X. vesicatoria* dans cette région. Aussi, après les reclassifications de Vauterin, de Jones ou de Schaad (Jones *et al.*, 2004; Schaad *et al.*, 2005; Vauterin *et al.*, 1995), il est apparu nécessaire de décrire plus finement la diversité spécifique des *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne dans la région.

1. Classification et diversité des *Xanthomonas* pathogènes des Solanées

Nous avons mené une analyse de la diversité des *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne des Solanées en combinant deux échelles spatiales d'étude (une collection mondiale et une collection régionale) et deux techniques moléculaires (AFLP et MLSA). C'est la première fois que ces méthodes à haut débit sont utilisées pour l'analyse à grande échelle de la diversité des *Xanthomonas* pathogènes des Solanées. Les études antérieures de la diversité de ces agents pathogènes ont été basées sur des méthodes phénotypiques (activités amylolytique et pectinolytique, profils d'assimilation de sources de carbone par la technique Biolog, races, spectres de sensibilité à une gamme de bactériophages, sensibilité au cuivre et à la streptomycine, variabilité sérologique, profils protéiques, profils d'acides gras) et/ou des méthodes de génotypage de première génération (RFLP et PFGE) beaucoup plus lourdes opératoirement et moins informatives que les techniques basées sur la PCR (Bouzar *et al.*, 1994a; Bouzar *et al.*, 1994b; Bouzar *et al.*, 1996; Bouzar *et al.*, 1999; Sahin & Miller, 1996). Seul Louws *et al.* ont analysé la diversité de ce groupe par la technique rep-PCR (Louws *et al.*, 1995). Les données issues de ces travaux ont été à la base de l'identification de 5 groupes

de souches correspondant aux espèces *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* et *X. gardneri* ainsi que *X. campestris* pv. *raphani* (Jones *et al.*, 2004; Vauterin *et al.*, 1995).

Les analyses AFLP et MLSA de la collection mondiale nous ont permis d'obtenir des représentations concordantes sur la structuration et la diversité des *Xanthomonas* spp. associés aux Solanées et en accord avec les données de la littérature (Bouzar *et al.*, 1996; Bouzar *et al.*, 1999; Louws *et al.*, 1995; Sahin & Miller, 1996). La technique AFLP permet de générer des marqueurs neutres répartis sur l'ensemble du génome bactérien alors que la MLSA ne permet d'analyser qu'un petit nombre de gènes de ménage mais, étant basée sur des données de séquence, elle est caractérisée par une excellente reproductibilité inter-laboratoires (bases de données web) et permet d'avoir des informations précises sur les forces évolutives associées à la diversité décrite. Ces deux techniques ont été déjà utilisées pour évaluer la diversité intraspécifique et intrapathovar chez *X. citri* et ont produit des données concordantes (Ah-You *et al.*, 2009; Bui Thi Ngoc *et al.*, 2010).

Nous avons obtenu une structure polyphylétique avec 4 entités génétiques fortement différenciées. Un premier profil comprend des souches appartenant au groupe génétique 9.2 de l'espèce *X. axonopodis* (Rademaker *et al.*, 2000). Un deuxième et un troisième profil correspondent respectivement aux souches des espèces *X. vesicatoria* et *X. gardneri*. Le dernier correspond à des souches isolées de tomates aux USA et en Afrique et qui sont proches génétiquement de *X. campestris* pv. *raphani*. De telles souches ont été identifiées auparavant dans l'état d'Ontario au Canada (Kuflu & Cuppels, 1997). Nos données ont confirmé de fortes similarités génétiques entre *X. alfalfae*, *X. euvesicatoria* et *X. perforans* d'une part et entre *X. cynarae* et *X. gardneri* d'autre part, qui ont probablement le statut d'espèces-synonyme (Parkinson *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2008). L'absence de données phénotypiques claires confirmant les similarités génétiques mises en évidence complique la publication de descriptions d'espèces révisées. Les tests biochimiques et physiologiques classiques (Dye, 1962) ne permettent pas de différencier de nombreuses espèces génomiques de *Xanthomonas*. La structuration de *X. axonopodis* en groupes génétiques (ou espèces nommées en corrélation avec ces groupes) telle que définie par Rademaker et travaux ultérieurs n'est pas reproduite sur la base de données phénotypiques de spectres d'assimilation de substrats carbonés (Biolog) (Roumagnac *et al.*, 2004). Les similarités génétiques mises en évidence entre *X. cynarae* et *X. gardneri* ne sont pas reflétées par les données Biolog générées pour ces souches (Jones *et al.*, 2004; Trébaol *et al.*, 2000). Enfin, certaines espèces (*X. arboricola*, *X. axonopodis*, *X. campestris*, *X. hortorum*) ne produisent pas de profils

d'acides gras (FAME) caractéristiques, rendant de fait difficile l'utilisation de cette technique en taxonomie phénotypique (Vauterin *et al.*, 1996).

Les deux techniques AFLP et MLSA nous ont permis aussi d'évaluer la diversité intraspécifique des *Xanthomonas* spp. responsables de la gale bactérienne des Solanées.

- Au sein du groupe génétique 9.2 de l'espèce *X. axonopodis*, 3 groupes de souches se distinguent. Ils forment des groupes robustes par AFLP et correspondent à trois sequevars en MLSA. Le premier groupe de souches correspond à l'espèce *X. euvesicatoria sensu* Jones *et al.* (2004). La faible diversité génétique mise en évidence dans ce groupe est en accord avec les données de séquence (Wichmann *et al.*, 2005). Ces auteurs ont évalué l'existence du plus proche ancêtre commun de la population actuelle de *X. euvesicatoria* comme datant de 28 à 1432 ans et ont montré que ce temps coïncide avec le début de l'agriculture moderne. Le second groupe correspond à *X. perforans sensu* Jones *et al.* (2004). Le troisième groupe renferme 6 souches provenant d'Inde et de Grenade. Les données des tests biochimiques (activités amylolytique et pectinolytique) et de pouvoir pathogène nous permettent de faire un rapprochement entre ces souches et les souches du groupe A1 décrit à la Barbade et qui étaient incluses dans les travaux de Jones *et al.* (Bouzar *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2000). Ces souches de Barbade se sont avérées proches génétiquement et différentes phénotypiquement des souches de l'espèce *X. euvesicatoria*. Toutefois, nous sommes prudents dans le rapprochement que nous faisons entre les souches d'Inde et de Grenade avec les souches de Barbade (A1), car seule une étude comparative nous permettrait de confirmer notre hypothèse. Malheureusement, aucune des souches A1 n'est inscrite dans les collections internationales et malgré nos efforts nous n'avons pas pu nous en procurer auprès des laboratoires détenteurs. Nous avons montré que ces 3 groupes de souches sont caractérisés par des distances AFLP équivalant à des valeurs de $\Delta T_m \leq 2^\circ\text{C}$ et méritent d'appartenir à une même espèce. L'aptitude naturelle de ce groupe de souches à échanger du matériel génétique par conjugaison pourrait être à l'origine de l'assez grande diversité observée (Basim *et al.*, 1999).
- L'analyse de la diversité au sein de l'espèce *X. vesicatoria* a révélé une structuration des souches en 5 groupes génétiques correspondant à 5 sequevars. Cette structuration n'est pas liée à l'origine géographique des souches. Une structuration génétique au sein de cette espèce indépendante de l'origine géographique a déjà été mise en évidence par rep-PCR (Louws *et al.*, 1995).

- Les souches décrites comme *X. gardneri* se sont avérées génétiquement peu polymorphes, à l'exception d'une souche originaire de Nouvelle Zélande (ICMP 7383).

L'application de notre approche à l'échelle régionale nous a permis de mettre en évidence une grande diversité des *Xanthomonas* pathogènes des Solanées dans la région Océan Indien avec la présence de l'ensemble des espèces décrites à l'exception de *X. campestris* pv. *raphani*. La coexistence de deux ou plusieurs espèces dans un territoire donné a déjà été décrite dans d'autres régions du monde (par exemple Ohio, Floride, Mexique, Guatemala, Costa Rica) (Bouzar *et al.*, 1999; Sahin & Miller, 1996). Cependant, les résultats de Bouzar *et al.* suggèrent la présence unique de *X. euvesicatoria* dans l'archipel des Caraïbes (Bouzar *et al.*, 1999). Nous avons montré l'existence d'une plus grande diversité dans notre région. Une telle structuration de l'agent pathogène dans la région pourrait s'expliquer par des événements de transmission par les semences. Il n'existe en effet pas de commerce régional de transplants. Les semences de piment et de tomate utilisées dans la région Océan Indien sont importées de diverses régions du monde. La propagation des espèces de *Xanthomonas* entre les différents pays de la région pourrait se faire également à travers les échanges de fruits de tomates et de piments dans la région. A notre connaissance, dans la région Océan Indien, seule la Réunion dispose depuis quelques années d'un dispositif de production de plants maraîchers selon la norme qualité CE. En revanche, l'absence de cas de gale bactérienne dans les plants soumis à cette norme ces dernières années (plusieurs millions de plants produits annuellement) suggère que les lots contaminés ne pourraient provenir que de certaines origines. La structuration indépendante de l'origine géographique des souches observée chez l'espèce *X. vesicatoria* est compatible avec une hypothèse de transmission par les semences. Pour cette espèce, nous avons montré par AFLP que des souches isolées à la Réunion et à Madagascar formant un cluster solide, présentaient une grande similitude génétique avec des souches de collection en provenance de France et d'Italie, ce qui renforce cette hypothèse de transmission via les semences au cours d'échanges commerciaux. Une transmission par les semences semble être à l'origine de l'épidémie de la gale bactérienne causée récemment au Brésil par *X. gardneri* (Quezado-Duval *et al.*, 2004). La présence dans les semences de Solanées de *Xanthomonas* pathogènes a été démontrée il y a plusieurs décennies (Bashan *et al.*, 1982). A cette époque, l'ensemble des souches était dénommé *X. campestris* pv. *vesicatoria* en accord avec la classification en vigueur à cette époque. Il n'a pas depuis été établi si l'ensemble des espèces associées à la gale bactérienne peuvent être transmises par semences, mais la situation dans la région est compatible avec une telle hypothèse.

Nos résultats et ceux d'autres études menées en régions tropicales et subtropicales (Bouzar *et al.*, 1996; Bouzar *et al.*, 1999) suggèrent une présence majoritaire de souches de *X. euvesicatoria* (*X. axonopodis* pv. *vesicatoria* groupe A) dans ces régions. La raison d'un tel constat reste inconnue. Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être formulées : une meilleure capacité adaptative de ces souches en environnement tropical ou subtropical, une transmission plus active de ce groupe par les semences, l'existence de Solanées sauvages sensibles à ces souches pouvant agir en tant que réservoir d'inoculum...

2. Un événement de recombinaison chez certaines souches de *Xanthomonas euvesicatoria*

Les mécanismes de transferts horizontaux de gènes (THG) sont à la base de l'évolution des génomes bactériens et concernent souvent des gènes impliqués dans les interactions hôtes-bactéries (incluant le pouvoir pathogène) et l'adaptation aux niches écologiques. On peut citer par exemple le THG détecté chez *X. oryzae* au niveau des gènes impliqués dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (Patil *et al.*, 2007). Toutefois des analyses comparatives de génomes complets ont montré que beaucoup d'autres types de gènes sont transférés horizontalement. En effet, en comparant 116 génomes complets de procaryotes incluant le génome de *X. axonopodis* pv. *citri* et *X. campestris* pv. *campestris*, Nakamura *et al.* ont classé les gènes selon leur degré d'implication dans les événements de THG (Nakamura *et al.*, 2004). Parmi les gènes peu transférés ou maintenus, on trouve ceux impliqués dans la transmission de l'information cellulaire (translation, transcription et réplication). Parmi les gènes fréquemment transférés/maintenus, on trouve les éléments mobiles et les gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire y compris les gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN qui par ordre décroissant arrivent en dernière position dans cette catégorie. Des résultats analogues ont été décrits ailleurs (Beiko *et al.*, 2005). Aussi, en étudiant l'histoire évolutive de 205 gènes conservés chez 13 espèces de gammaprotéobactéries, Susko *et al.* ont suggéré qu'au moins 10% des gènes appartenant au « core genome » (la partie du génome commune à toutes ces bactéries) ont été transférés horizontalement au cours de l'évolution (Susko *et al.*, 2006). Par ailleurs, chez l'espèce *X. euvesicatoria* (souche 85-10) la présence dans le génome d'un nombre important de séquences insertionnelles et d'une région dont le contenu en G+C est différent des autres régions, suggère une assez grande plasticité de ce génome (Thieme *et al.*, 2005). Les événements de THG mis en évidence chez *X. euvesicatoria in planta* en sont une confirmation (Basim *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les techniques AFLP et MLSA ont produit des résultats congruents et mettent en évidence une structuration marquée des espèces de *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne ce qui suggère que les réorganisations génomiques entre espèces associées à des transferts horizontaux de gènes et/ou des événements de recombinaison sont suffisamment limitées pour ne pas perturber cette structure, alors que ces souches partagent la même niche écologique. Un tel phénomène a été décrit chez *Escherichia coli* (Lawrence & Ochman, 1998). Il est également possible que les recombinaisons ne soient pas facilement détectables si elles concernent très majoritairement des partenaires phylogénétiquement proches.

Les tests de Shimodaira-Hasegawa (S-H test) ont révélé une absence de congruence entre les topologies des arbres de maximum de vraisemblance issus de chacun des quatre gènes séquencés et celui construit sur la base des séquences concaténées. Une telle non-congruence peut avoir plusieurs origines (Comas *et al.*, 2006) :

- un bruit phylogénétique qui peut être dû à des séquences avec un signal phylogénétique faible ou des gènes qui évoluent rapidement. Les gènes que nous avons choisis (gènes de ménage) évoluent très lentement.
- Le phénomène d'attraction des longues branches. Il n'est pas possible d'exclure cette hypothèse bien que la méthode de maximum de vraisemblance que nous avons utilisée soit l'une des méthodes d'analyse qui permettent de réduire l'attraction des longues branches (Bergsten, 2005). Le polymorphisme de séquence détecté était majoritairement localisé au niveau de la troisième position de codon. L'élimination de cette position dans les jeux de données, préconisée pour réduire le phénomène d'attraction des longues branches n'a donc pu être envisagé. La comparaison des topologies incluant et excluant un « outgroup » proposée confirme les absences de congruence quels que soient les jeux de données utilisés.
- Des événements de THG. C'est une hypothèse plausible pour expliquer l'absence de congruence entre les topologies dérivées des quatre portions de gènes puisque plusieurs événements de recombinaison ont été identifiés dans trois portions des gènes (*atpD*, *dnaK* et *gyrB*) par plusieurs algorithmes indépendants en utilisant le logiciel RDP.

Un seul événement de recombinaison a été détecté parmi les souches pathogènes des Solanées (*X. euvesicatoria* ST E1) sur une portion du gène *atpD* codant pour la sous-unité β de l'ATP synthase. L'alignement de la région recombinante montre que l'espèce possédant la séquence

la plus proche est *X. melonis*. La séquence chez les souches de cette espèce est cependant trop divergente de celle détectée chez *X. euvesicatoria* ST E1 pour faire l'hypothèse d'une recombinaison entre souches contemporaines de ces deux groupes. De plus, l'hypothèse d'un THG entre un *Xanthomonas* pathogène des Solanées et un *Xanthomonas* pathogène des cucurbitacées paraît peu probable car la séparation des niches écologiques constitue une barrière au flux de gènes (Cohan, 2002 ; Costechareyre *et al.*, 2009).

La recombinaison implique le partage d'une même niche écologique. Un tel événement aurait pu se produire de façon ancestrale chez des souches pathologiquement plus « généralistes » ayant de ce fait pu partager la même niche écologique. Il est probable que le développement de l'agriculture et son intensification aient permis la spécialisation pathologique récente de nombreux organismes phytopathogènes (Stuckenbrock & Mac Donald, 2008). Les travaux de Comas *et al.* ont suggéré que des événements de recombinaison ancestraux parmi des gènes fortement conservés chez les protéobactéries contribuent à expliquer le placement des Xanthomonadales parmi les protéobactéries (Comas *et al.*, 2006).

Une autre hypothèse possible serait que cet événement ait eu lieu entre *X. euvesicatoria* ST E1 et des *Xanthomonas* saprophytes. De telles souches ont été isolées à partir de transplants de tomate et de poivron aux USA (Gitaitis *et al.*, 1987). Néanmoins, la majorité des données de séquences disponibles concernent aujourd'hui les organismes pathogènes, qui ne représentent qu'un spectre étroit de la diversité écologique et phylogénétique du monde microbien (Vos & Didelot, 2009). Cependant, les méthodes de typage à haut débit comme la MLST par exemple sont de plus en plus utilisées par les microbiologistes écologues et l'on peut s'attendre dans le futur à disposer de données pour l'ensemble des bactéries.

Enfin, on ne peut totalement exclure que la recombinaison ait impliqué une bactérie d'un autre genre bien qu'il existe une corrélation entre la fréquence des THG et la proximité phylogénétique entre les souches concernées (Ragan, 2001). Un assez grand nombre d'évènements de THG ont été mis en évidence entre les alpha, beta et gammaprotéobactéries (Beiko *et al.*, 2005).

Il existe peu des travaux antérieurs ayant mis en évidence des échanges de gènes du métabolisme primaire par THG chez les *Xanthomonas*. En 2008, dans une étude sur les THG chez les Xanthomonadales, Lima *et al.* montrèrent l'existence de 2 types d'ilots de gènes acquis par THG, les ilots de gènes issus de THG récents, caractérisés par une forte présence d'éléments mobiles et de gènes ayant un niveau élevé de déviation de nucléotides, impliqués

surtout dans la pathogénie et l'adaptation écologique, et les îlots associés à des THG anciens caractérisés par la présence d'éléments mobiles et des gènes ayant un faible niveau de déviation de nucléotides et qui sont plutôt impliqués dans le métabolisme primaire (Lima *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2008). Par ailleurs, les travaux de Lima & Menck suggèrent que les gènes de la voie de synthèse de l'arginine chez les Xanthomonadales auraient été acquis par THG (Lima & Menck, 2008).

3. De la similitude génétique à la similitude biologique

Nous avons exploité dans ce travail la similitude génétique révélée par des méthodes de génotypage à haut débit comme l'AFLP et la MLSA pour tester de façon ciblée des similitudes biologiques.

Nous avons ainsi montré pour la première fois une similarité biologique entre *X. gardneri* et *X. cynarae*, des espèces très proches génétiquement. Nos données montrent que les deux espèces sont pathogènes aussi bien sur Solanées (tomate et *Capsicum* spp.) que sur artichaut (famille des Astéracées). Ce cas est plutôt rare chez les *Xanthomonas*. En effet, le genre *Xanthomonas* qui comprend 28 espèces et de nombreux pathovars, s'attaque à plus de 400 plantes mais très souvent avec une grande spécificité d'hôte (Hayward, 1993). Un autre exemple avéré de large gamme d'hôtes comprend les souches de *X. campestris* pv. *raphani* dont les hôtes naturels comprennent à la fois des Crucifères et des Solanées (Fargier & Manceau, 2007; Kuflu & Cuppels, 1997). Quelques autres cas concernent des descriptions de gammes d'hôtes larges sur la base de tests de pouvoir pathogène, mais sans démonstration que les espèces végétales sont des hôtes naturels. C'est le cas par exemple de *X. axonopodis* pv. *allii* et de *X. axonopodis* pv. *alfalfae* (synonyme *X. alfalfae* subsp. *alfalfae*), qui produisent des symptômes similaires à *X. axonopodis* pv. *citrumelo* lorsqu'ils sont inoculés sur agrumes (Gent *et al.*, 2005). C'est pour cette raison que nous avons inoculé la souche-type de *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* sur Solanées, mais elle ne s'est pas avérée pathogène.

La compréhension du pouvoir pathogène de *X. cynarae-gardneri* sur plusieurs hôtes différents pourrait progresser par analyse comparée du génome de souches originaires de Solanées et d'artichaut, en particulier en comparant les répertoires de gènes impliqués dans la pathogénie entre ces souches, y compris ceux codant des effecteurs de type III (Hajri *et al.*, 2009 ; Vinatzer *et al.*, 2006). En étudiant la relation entre la présence/absence de 35 effecteurs de type III sur 132 souches appartenant à 18 pathovars de *X. axonopodis*, Hajri *et al.* (2009) ont

montré une bonne corrélation entre les répertoires d'effecteurs de type III et la classification en pathovars. Des travaux sur le répertoire d'effecteurs de type III de *P. syringae* pv. *syringae* suggérèrent que certains effecteurs de type III sont associés à la capacité de la bactérie à se multiplier et survivre sur une gamme d'hôtes élargie (Vinatzer *et al.*, 2006). De plus, nos données ont été obtenues en inoculant les bactéries par infiltration dans les espaces intercellulaires du parenchyme. Il serait intéressant de mesurer la capacité épidémique de *X. cynarae-gardneri* sur Solanées et artichaut en conditions naturelles.

4. Amélioration de l'outil PCR et mise au point d'un outil de diagnostic pour la détection des *Xanthomonas* pathogènes des Solanées dans les semences.

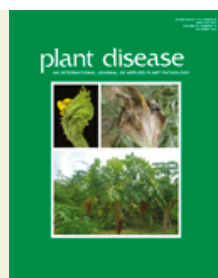
Dans cette étude, nous avons mis au point un protocole d'identification par PCR de la gale bactérienne de la tomate et du piment. Ce protocole met en jeu 4 réactions différentes pour détecter l'ensemble des espèces de *Xanthomonas* pathogène sur Solanées. La prochaine étape sera de rationaliser ce protocole en diminuant le nombre de réactions par multiplexage des différentes paires d'amorces.

Il a été démontré que l'agent pathogène sous son ancienne appellation de *X. campestris* pv. *vesicatoria* était transmissible par semence (Bashan *et al.*, 1982) et il est fortement probable que cette transmission par semences soit responsable de l'expansion de cette maladie au niveau mondial, via les échanges de semences. De nos jours, l'intensification des échanges commerciaux, favorisés par l'augmentation des transports internationaux ou encore la suppression des barrières douanières, augmente le risque d'extension à l'échelle mondiale d'épidémie dues à de tels agents phytopathogènes. De ce fait, il est indispensable de pouvoir détecter la bactérie dans les semences de manière suffisamment sensible. C'est pourquoi nous envisageons par la suite de faire évoluer notre outil actuel en multiplex PCR temps réel. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, cette technique possède beaucoup d'avantages comparée aux autres techniques PCR usuelles notamment, elle est plus rapide, et dotée d'une grande sensibilité (l'équivalent d'une PCR nichée). Dans le cas de la technologie Taqman® que nous envisageons de mettre en œuvre, la technique est aussi d'une grande spécificité. Enfin, cette technique PCR temps réel est adaptée au traitement d'un grand nombre d'échantillons, ce qui est compatible avec de grands effectifs à tester dans le cadre d'une certification de semences. Une des applications importantes d'un tel outil diagnostique serait de

statuer si l'ensemble des espèces de *Xanthomonas* associés à la gale bactérienne a la capacité de coloniser les semences et d'y survivre.

Actuellement, seul le génome de la souche 85-10 de *X. euvesicatoria* est entièrement séquencé. D'autres souches appartenant aux espèces *X. vesicatoria*, *X. perforans* et *X. gardneri* sont en cours de séquençage (<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages/207778.html>). La disponibilité de ces séquences ouvrira des nouveaux horizons en matière de diagnostic et de taxonomie des agents responsables de la gale bactérienne des Solanées.

Annexes



ISSN: 0191-2917

SEARCH

Enter Keywords

- ☐ Phytopathology
- ☒ Plant Disease
- ☐ MPMI

search

[Advanced Search](#)

Inside the Journal

BACK ISSUES

(Issues before 1997)

[First Look](#)[View Most Downloaded Articles](#)[About Plant Disease](#)[Editorial Board](#)[Submit a Manuscript](#)[Author Instructions](#)[Policies/Procedures](#)[Online e-Xtras](#)

= "Open" Access

[Subscribe](#) [Free alerts](#) [RSS](#)

plant disease

Editor-in-Chief: R. Michael Davis

Published by The American Phytopathological Society

[Home](#) > [Plant Disease](#) > [Table of Contents](#) > [Abstract](#)[Previous Article](#) | [Next Article](#)

October 2010, Volume 94, Number 10

Page 1264

DOI: 10.1094/PDIS-05-10-0397

Disease Notes

A New Type of Strain of *Xanthomonas euvesicatoria* Causing Bacterial Spot of Tomato and Pepper in Grenada

A. A. Hamza, I. Robène-Soustrade, C. Boyer, A. Laurent, E. Jouen, E. Wicker, P. Prior, and O. Pruvost, CIRAD-Université de la Réunion, UMR PVBMT, Saint Pierre, La Réunion, F-97410 France; and M. Dottin, Ministry of Agriculture, Saint George, Grenada

Bacterial spot of tomato and pepper (BSTP) can be caused by several *Xanthomonas* genospecies (2). BSTP is a major disease in Grenada where A and B phenotypic groups (*Xanthomonas euvesicatoria* and *X. vesicatoria*, respectively, [2]) have been reported (3). There is no previous report of group A strains, which are strongly amylolytic and pectolytic, in Grenada. In March 2007, tomato and pepper leaves with lesions typical of BSTP were collected in Saint David and Saint Andrew parishes of Grenada. Bacterial isolations were performed on KC semiselective agar medium (4), resulting in isolation of five yellow-pigmented, *Xanthomonas*-like strains. Three strains isolated from tomato or pepper in Saint David were negative for starch hydrolysis and pectate degradation, two tests that were found useful for strain identification in the 1990s (2). Two strains isolated from pepper in Saint David were strongly amylolytic and degraded pectate. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and multilocus sequence analysis (MLSA) assays targeting *atpD*, *dnaK*, *efp*, and *gyrB* were performed on the five strains from Grenada together with a type strain of each of *X. euvesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, and *X. vesicatoria* as well as other reference strains of *X. euvesicatoria* and *X. perforans* as described previously (1). All strains from Grenada were identified as *X. euvesicatoria* regardless of the typing technique. On the basis of AFLP assays, the two strains with phenotypic features not reported in Grenada were closely related (distances of ≤ 0.002 nucleotide substitutions per site [1]) to a group of strains from India (ICMP 3381, LMG 907, LMG 908, and LMG 918). These two strains were also identical to the Indian strains based on MLSA, but differed from the *X. euvesicatoria* type strain by at least one nucleotide substitution in all loci examined. The three strains from Grenada that were negative for starch hydrolysis and pectate degradation had sequences identical to that of the type strain. Young leaves of tomato plants of cv. Marmande and pepper plants of cvs. Yolo Wonder and Aiguille were infiltrated (six inoculation sites per leaf, three replicate plants per cultivar per experiment, and the experiment was replicated once) using inoculum of each of the five strains from Grenada made from suspensions in Tris buffer containing approximately 1×10^5 CFU/ml. Two reference strains of *X. euvesicatoria* (NCPBP 2968 and LMG 922) were also inoculated as positive control treatments. Negative control treatments consisted of leaves infiltrated with sterile Tris buffer. Typical water-soaked lesions that developed into necrotic spots were observed 3 to 8 days after inoculation

Quick Links

[Add to favorites](#)[E-mail to a colleague](#)[Alert me when new articles cite this article](#)[Download to citation manager](#)[Related articles found in APS Journals](#)

This Journal is brought to you via a subscription from the CIRAD Dist

(dai) for all strains on all cultivars, except NCPPB 2968, which was not pathogenic on pepper cv. Aiguille. *Xanthomonas* population sizes from lesions plated onto KC agar medium (4) 25 dai ranged from 3×10^6 to 5×10^7 , 8×10^7 to 2×10^8 , and 9×10^6 to 2×10^8 CFU/lesion on tomato cv. Marmande and pepper cvs. Yolo Wonder and Aiguille, respectively. The epidemiological importance of this previously unreported group of *X. euvesicatoria* strains in Grenada needs to be assessed.

References: (1) L. Bui Thi Ngoc et al. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:515, 2010. (2) J. B. Jones et al. Syst. Appl. Microbiol. 27:755, 2004. (3) L. W. O'Garro. Plant Dis. 82:864, 1998. (4) O. Pruvost et al. J. Appl. Microbiol. 99:803, 2005.



Symptômes causés par inoculations artificielles des différentes espèces de *Xanthomonas spp.* des solanées sur différents hôtes (a) symptômes provoqués par *X. euvesicatoria* (NCPB2968) sur feuilles de tomate (b) symptômes provoqués par *X. vesicatoria* (LMG911) sur feuilles de tomate (c) symptômes provoqués par *X. perforans* (NCPB4321) sur feuilles de tomate, (d) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB881) sur feuille de tomate (e) symptômes provoqués par *X. euvesicatoria* (NCPB2968) sur feuille de tomate (f) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB2968) sur feuille de poivron (g) symptômes provoqués par *X. euvesicatoria* (LMG922) sur feuille de poivron (h) symptômes provoqués par *X. euvesicatoria* (LD55) sur feuille de piment (i) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB881) sur feuille de piment (j) symptômes provoqués par *X. cynarae* (CFBP4188) sur feuille d'artichaut (k) symptômes provoqués par *X. cynarae* (CFBP4188) sur feuille de piment (l) symptômes provoqués par *X. cynarae* (CFBP4188) sur feuille de poivron (m) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB881) sur feuille d'artichaut (n) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB881) sur feuille de piment (o) symptômes provoqués par *X. gardneri* (NCPB881) sur feuille de poivron.



Symptômes causés par inoculations artificielles de *X. c. pv. raphani* (p, q) symptômes provoqués par *X. c. pv. raphani* (CFBP5827, CFBP5829) sur feuilles de radis (r) symptômes provoqués par *X. c. pv. raphani* (ICMP110 souche isolé de tomate) sur tige de tomate (s) symptômes provoqués par *X. c. pv. raphani* (ICMP110) sur feuilles de tomate (t) symptômes provoqués par *X. c. pv. raphani* (ICMP110) sur feuilles de radis (u) symptômes provoqués par *X. c. pv. raphani* (LMG 10429 souche isolée de tomate) sur feuilles de radis

Références bibliographiques

- Abbasi P.A., Soltani N., Cuppels D.A. & Lazarovits G. (2002) Reduction of bacterial spot disease severity on tomato and pepper plants with foliar applications of ammonium lignosulfonate and potassium phosphate. *Plant Dis.* 86: 1232-1236.
- Abbasi P.A., Cuppels D.A. & Lazarovits G. (2003) Effect of foliar applications of neem oil and fish emulsion on bacterial spot and yield of tomatoes and peppers. *Can. J. Plant. Pathol.* 25: 41-48.
- Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A. & Carniel E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14043-14048.
- Ah-You N., Gagnevin L., Grimont P.A.D., Brisse S., Nesme X., Chiroleu F., Bui Thi Ngoc L., Jouen E., Lefeuvre P., Vernière C. & Pruvost O. (2009) Polyphasic characterization of xanthomonads pathogenic to Anacardiaceae and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 306-318.
- Aittamaa M., Somervuo P., Pirhonen M., Mattinen L., Nissinen R., Auvinen P. & Valkonen J.P.T. (2008) Distinguishing bacterial pathogens of potato using a genome-wide microarray approach. *Mol. Plant. Pathol.* 9: 705-717.
- Al-Dahmani J.H., Abbasi P.A., Miller S.A. & Hoitink H.A.J. (2003) Suppression of bacterial spot of tomato with foliar sprays of compost extracts under greenhouse and field conditions. *Plant Dis.* 87: 913-919.
- Alfano J.R. & Collmer A. (2004) Type III secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 385-414.
- Alvarez A.M. (2004) Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339-366.
- Ameziane N., Bogard M. & Lamoril J. (2005) *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Paris: Elsevier.
- Astua-Monge G., Minsavage G.V., Stall R.E., Davis M.J., Bonas U. & Jones J.B. (2000a) Resistance of tomato and pepper to T3 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is specified by a plant-inducible. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 911-921.
- Astua-Monge G., Minsavage G.V., Stall R.E., Vallejos C.E., Davis M.J. & Jones J.B. (2000b) Xv4-vrxv4: A new gene-for-gene interaction identified between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* race T3 and the wild tomato relative *Lycopersicon pennellii*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1346-1355.
- Ballvora A., Pierre M., Van den Ackerveken G., Schornack S., Rossier O., Ganai M., Lahaye T. & Bonas U. (2001) Genetic mapping and functional analysis of the tomato Bs4 locus governing recognition of the *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* AvrBs4 protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 629-638.
- Bashan Y., Okon Y. & Henis Y. (1982) Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. *Phytopathology* 72: 1143-1144.
- Bashan Y. (1985) Field dispersal of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Alternaria macrospora* by animals, people, birds, insects, mites, agricultural tools, aircraft, soil particles, and water sources. *Can. J. Bot.* 64: 276-281.
- Bashan Y. & Okon Y. (1986) Internal and external infections of fruits and seeds of peppers by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Can. J. Bot.* 64: 2865-2871.
- Basim H., Stall R.E., Minsavage G.V. & Jones J.B. (1999) Chromosomal gene transfer by conjugation in the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 89: 1044-1049.
- Beattie G.A. & Lindow S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: A spectrum of strategies. *Phytopathology* 89: 353-359.
- Beiko R.G., Harlow T.J. & Ragan M.A. (2005) Highways of gene sharing in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14332-14337.

- Benedict A.A., Alvarez A.M. & Pollard L.W. (1990) Pathovar-specific antigens of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* detected with monoclonal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 572-574.
- Berg T., Tesoriero L. & Hailstones D.L. (2005) PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pathovars in *Brassica* seed. *Plant Pathol.* 54: 416-427.
- Berg T., Tesoriero L. & Hailstones D.L. (2006) A multiplex real-time PCR assay for detection of *Xanthomonas campestris* from brassicas. *Lett. Appl. Microbiol.* 42: 624-630.
- Bergsten J. (2005) A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163-193.
- Bernal R.F. & Berger R.D. (1996) The spread of epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper in the field. *J. Phytopathol.* 144: 479-484.
- Bertolini E., Olmos A., Martinez M.C., Gorris M.T. & Cambra M. (2001) Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colorimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods* 96: 33-41.
- Bertolini E., Olmos A., Lopez M.M. & Cambra M. (2003) Multiplex nested reverse transcription-Polymerase Chain Reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 93: 286-292.
- Blancard D. (1988) *Maladies de la tomate: observer, identifier, lutter*. Paris: INRA.
- Blancard D. (2009) *Les maladies de la tomate: identifier, connaître, maîtriser*. Paris: INRA.
- Blom J., Albaum S.P., Doppmeier D., Pühler A., Vorhölter F., Zakrzewski M. & Goesmann A. (2009) EDGAR: A software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC Bioinformatics* 10: 154.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A. & Bonas U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509-1512.
- Boch J. & Bonas U. (2010) *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 419-436.
- Bogdanove A.J., Beer S.V., Bonas U., Boucher C.A., Collmer A., Coplin D.L., Cornelis G.R., Huang H.C., Hutcheson S.W., Panopoulos N.J. & Van Gijsegem F. (1996) Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* 20: 681-683.
- Bonas U., Stall R.E. & Staskawicz B. (1989) Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol. Gen. Genet.* 218: 127-136.
- Bonas U., Van den Ackerveken G., Buttner D., Hahn K., Marois E., Nennstiel D., Noel L., Rossier O. & Szurek B. (2000) How the bacterial plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* conquers the host. *Mol. Plant Pathol.* 1: 73-76.
- Bouchelta A., Boughdad A. & Blenzar A. (2005) Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera:Aleyrodidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9: 259-269.
- Boucher C., Genin S. & Arlat M. (2001) Concepts actuels sur la pathogénie chez les bactéries phytopathogènes. *C.R. Acad. Sci. Paris* 324: 915-922.
- Boudon S., Manceau C. & Notteghem J.L. (2005) Structure and origin of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* populations causing bacterial spot of stone fruit trees in Western Europe. *Phytopathology* 95: 1081-1088.
- Boulouis H.J., Haddad N. & Maillard R. (2001) Technique d'étude moléculaire des isolats: principes et fiabilité. *Epidémiol. et Santé Anim.* 39: 21-29.
- Bouzar H., Jones J.B., Minsavage G.V., Stall R.E. & Scott J.W. (1994a) Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining. *Phytopathology* 84: 39-44.
- Bouzar H., Jones J.B., Stall R.E., Hodge N.C., Minsavage G.V., Benedict A.A. & Alvarez A.M. (1994b) Physiological, chemical, serological, and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* strains. *Phytopathology* 84: 663-671.

- Bouzar H., Jones J.B., Somodi G.C., Stall R.E., Daouzli N., Lambe R.C., Felix G., R. & Trinidad C., R. (1996) Diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper fields of Mexico. *Can. J. Plant Pathol.* 18: 75-77.
- Bouzar H., Jones J.B., Stall R.E., Louws F.J., Schneider M., Rademaker J.L.W., De Bruijn F.J. & Jackson L.E. (1999) Multiphasic analysis of xanthomonads causing bacterial spot disease on tomato and pepper in the Caribbean and Central America: Evidence for common lineages within and between countries. *Phytopathology* 89: 328-335.
- Brenner D.J., Fanning G.R., Rake A.V. & Johnson K.E. (1969) Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem* 28: 447-459.
- Brugmans B., Van der Hulst G.M., Visser R.G.F., Lindhout P. & Van Eck J. (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Res.* 31: e55.
- Bui Thi Ngoc L., Vernière C., Jouen E., Ah-You N., Lefeuvre P., Chiroleu F., Gagnevin L. & Pruvost O. (2010) Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence analysis-based genotypic relatedness among pathogenic variants of *Xanthomonas citri* pv. *citri* and *Xanthomonas campestris* pv. *bilvae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 515-525.
- Buonaurio R., Scarponi L., Ferrara M., Sidoti P. & Bertona A. (2002) Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 41-49.
- Buttner D., Noel L., Thieme F. & Bonas U. (2003) Genomic approaches in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* allow fishing for virulence genes. *J. Biotechnol.* 106: 203-214.
- Canteros B.I., Minsavage G.V., Pring D.R. & Stall R.E. (1990) Plasmid - encoded copper resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Vol. A. Klement, Z. (ed.) Budapest, Hungary: Akademiai Kiado Budapest, Hungary, pp. 351-356.
- Charudattan R., Stall R.E. & Batchelor D.L. (1973) Serotypes of *Xanthomonas vesicatoria* unrelated to its pathotypes. *Phytopathology* 63: 1260-1265.
- Chaux C.L. & Foury C.L. (1994) *Productions légumières*. Londres: TEC&DOC Lavoisier.
- Ching L.S. & Mohamed S. (2001) Alpha-tocopherol in 62 edible tropical plants. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3101-3105.
- Chun W., Cui J. & Poplawsky A. (1997) Purification, characterization and biological role of a pheromone produced by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Phys. Mol. Plant Pathol.* 51: 1-14.
- Cohan F.M. (2002) What are bacterial species ? *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 457-487.
- Colin J., Pussemier L. & Diouf A.M. (1984) Démonstration et application de l'antagonisme du à des *Pseudomonas* fluorescents sur des bactéries phytopathogènes. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 49: 587-596.
- Comas I., Moya A., Azad R.K., Lawrence J.G. & Gonzalez-Candelas F. (2006) The evolutionary origin of Xanthomonadales genomes and the nature of horizontal gene transfert. *Mol. Biol. Evol.* 23: 2049-2057.
- Cook A.A. & Stall R.E. (1963) Inheritance of resistance in pepper to bacterial spot. *Phytopathology* 53: 1060-1062.
- Cook A.A. & Guevara Y.G. (1984) Hypersensitivity in *capsicum chacoense* to race 1 of the bacterial spot pathogen of pepper. *Plant Dis.* 68: 329-330.
- Cornelis G.R. & Van Gijsegem F. (2000) Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 735-774.
- Costechareyre D., Bertolla F. & Nesme X. (2009) Homologous recombination in *Agrobacterium*: potential implications for the genomic species concept in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 26: 167-176.
- Crosa J.H., Brenner D.J. & Falkow S. (1973) Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J. Bacteriol.* 115: 904-911.
- Cubero J. & Graham J.H. (2005) Quantitative real-time polymerase chain reaction for bacterial enumeration and allelic discrimination to differentiate *Xanthomonas* strains on citrus. *Phytopathology* 95: 1333-1340.

- Cuppels D.A., Louws F.J. & Ainsworth T. (2006) Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial speck and bacterial spot pathogens of tomato. *Plant Dis.* 90: 451-458.
- Da Silva A.C., Ferro J.A., Reinach F.C., Farah C.S., Furlan L.R., Quaggio R.B., Monteiro-Vitorello C.B., Van Sluys M.A., Almeida N.F., Alves L.M., Do Amaral A.M., Bertolini M.C., Camargo L.E., Camarotte G., Cannavan F., Cardozo J., Chambergo F., Ciapina L.P., Cicarelli R.M., Coutinho L.L., Cursino-Santos J.R., El-Dorry H., Faria J.B., Ferreira A.J., Ferreira R.C., Ferro M.I., Formighieri E.F., Franco M.C., Greggio C.C., Gruber A., Katsuyama A.M., Kishi L.T., Leite R.P., Lemos E.G., Lemos M.V., Locali E.C., Machado M.A., Madeira A.M., Martinez-Rossi N.M., Martins E.C., Meidanis J., Menck C.F., Miyaki C.Y., Moon D.H., Moreira L.M., Novo M.T., Okura V.K., Oliveira M.C., Oliveira V.R., Pereira H.A., Rossi A., Sena J.A., Silva C., De Souza R.F., Spinola L.A., Takita M.A., Tamura R.E., Teixeira E.C., Tezza R.I., Trindade dos Santos M., Truffi D., Tsai S.M., White F.F., Setubal J.C. & Kitajima J.P. (2002) Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* 417: 459-463.
- Danks C. & Barker I. (2000) On-site detection of plant pathogens using lateral-flow devices. *EPPO Bulletin* 30: 421-426.
- Darlu P. & Tassy P. (1993) *La reconstruction phylogénétique*. Paris: Masson.
- De Boer S.H. & McNaughton M.E. (1987) Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. *Phytopathology* 77: 828-832.
- De Boer S.H., Elphinstone J.G. & Saddler G.S. (2007) Molecular detection strategies for phytopathogenic bacteria. In *Biotechnology and Plant Disease Management*. Punja, Z.K., De Boer, S.H. & Sanfaçon, H. (eds): CAB International.
- De Leon L., Siverio F. & Rodriguez A. (2006) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *J. Microbiol. Methods* 67: 141-149.
- De Ley J., Cattoir H. & Reynaerts A. (1970) The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 133-142.
- De Vos P. (1983) Intra-and intergenic similarities of *Pseudomonas* and *Xanthomonas* ribosomal nucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 487-509.
- DeLey J. (1978) Modern molecular methods in bacterial taxonomy: evaluation, application, prospects In *proc. Int. Conf. Plant Pathol. Bacteriol.* Vol. 4 Angers, pp. 347-357.
- Delsuc F., Brinkmann H. & Philippe H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* 6: 361-375.
- Delsusc F. & Douzery E.J.P. (2004) Les méthodes probabilistes en phylogénie moléculaire. In *Avenir et pertinence des méthodes d'analyse en phylogénie moléculaire*. Cibois, A., Bourgoin, T. & Silvain, J.-F. (eds). Paris: Société Française de Systématique, pp. 75-86.
- Doidge E.M. (1921) A tomato canker. *Ann. Appl. Biol.* 7: 407-430.
- Doré C. & Varoquaux F. (2006) *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Paris: Quae.
- Dow J.M., Feng J.X., Barber C.E., Tang J.L. & Daniels M.J. (2000) Novel genes involved in the regulation of pathogenicity factor production within the *rpf* gene cluster of *Xanthomonas campestris*. *Microbiology - UK* 146: 885-891.
- Dreier J., Bermpohl A. & Eichenlaub R. (1995) Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- Dye D.W. (1962) The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *N. Z. J. Sci.* 5: 393-416.
- Dye D.W. (1966) A comparative study of some atypical "xanthomonads". *N. Z. J. Sci.* 9: 843-854.
- Dye D.W. & Lelliott R.A. (1974) Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds). Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 243-249.
- Dye D.W., Bradbury J.F., Goto M., Hayward A.C., Lelliott R.A. & Schroth M.N. (1980) International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype strains. *Rev. Plant Pathol.* 59: 153-168.

- Esquibet M., Grenier E., Plantard O., Andaloussi F.A. & Caubel G. (2003) DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome* 46: 1077-1083.
- Falush D., Kraft C., Taylor N.S., Correa P., Fox J.G., Achtman M. & Suerbaum S. (2001) Recombination and mutation during long-term gastric colonization by *Helicobacter pylori*: estimates of clock rates, recombination size, and minimal age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15056-15061.
- Fargier E. & Manceau C. (2007) Pathogenicity assays restrict the species *Xanthomonas campestris* into three pathovars and reveal nine races within *X. campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathol.* 56: 805-818.
- Fegan M., Croft B.J., Teakle D.S., Hayward A.C. & Smith G.R. (1998) Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathol.* 47: 495-504.
- Feil E.J., Holmes E.C., Bessen D.E., Chan M.S., Day N.P.J., Enright M.C., Goldstein R., Hood D.W., Kalia A., Moore C.E., Zhou J. & Spratt B.G. (2001) Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 182-187.
- Feil E.J. & Spratt B.G. (2001) Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 561-590.
- Fessehaie A., De Boer S.H. & Lévesque C.A. (2003) An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* 93: 262-269.
- Fett W.F., Gerard H.C., Moreau R.A., Osman S.F. & Jones L.E. (1992) Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 2123-2130.
- Filliol I., Motiwalla A.S., Cavatore M., Qi W., Hazbon M.H., Bobadilla del Valle M., Fyfe J., Garcia-Garcia L., Rastogi N., Sola C., Zozio T., Guerrero M.I., Leon C.I., Crabtree J., Angiuoli S., Eisenach K.D., Durmaz R., Joloba M.L., Rendon A., Sifuentes-Osornio J., Ponce de Leon A., Cave M.D., Fleischmann R., Whittam T.S. & Alland D. (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set. *J. Bacteriol.* 188: 759-772.
- Flor H.H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.
- Fournier P.E., Suhre K., Fournous G. & Raoult D. (2006) Estimation of prokaryote genomic DNA G+C content by sequencing universally conserved genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1025-1029.
- Fry N.K., Afshar B., Visca P., Jonas D., Duncan J., Nebuloso E., Underwood A. & Harrison T.G. (2005) Assessment of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis for epidemiological genotyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 704-712.
- Gaia V., Fry N.K., Afshar B., Luck P.C., Meugnier H., Etienne J., Peduzzi R. & Harrison T.G. (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 2047-2052.
- Gardner M.W. & Kendrick J.B. (1921) Bacterial spot of tomato. *J. Agric. Res* 21: 123-156.
- Gassmann W., Dahlbeck D., Chesnokova O., Minsavage G.V., Jones J.B. & Staskawicz B.J. (2000) Molecular evolution of virulence in natural field strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 182: 7053-7059.
- Gent D.H., Al-Saadi A., Gabriel D.W., Louws F.J., Ishimaru C.A. & Schwartz H.F. (2005) Pathogenic and genetic relatedness among *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and other pathovars of *X. axonopodis*. *Phytopathology* 95: 918-925.
- Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L. & Swings J. (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 733-739.
- Gitaitis R.D., Sasser M.J., Beaver R.W., McInnes T.B. & Stall R.E. (1987) Pectolytic xanthomonads in mixed infections with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper transplant. *Phytopathology* 77: 611-615.

- Glaser P. (2005) Les puces à ADN vont-elles révolutionner l'identification des bactéries. *Médecine/Science* 21: 539-544.
- Glick D.L., Coffey C.M. & Sulzinski M.A. (2002) Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of geranium. *J. Phytopathol.* 150: 54-59.
- Godoy D., Randle G., Simpson A.J., Aanensen D.M., Pitt T.L., Kinoshita R. & Spratt B.G. (2003) Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2068-2079.
- Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P. & Tiedje J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 81-91.
- Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A. & Hanaki K.-I. (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46: 167-172.
- Grimont P.A.D. (1988) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* 34: 541-546.
- Gudesblat G.E., Torres P.S. & Vojnov A.A. (2009) *Xanthomonas campestris* overcomes *Arabidopsis* stomatal innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol.* 149: 1017-1027.
- Gürlebeck D., Thieme F. & Bonas U. (2006) Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of Plant Physiol.* 163: 233-255.
- Gut I.G. (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Human Mutat.* 17: 475-492.
- Gutacker M.M., Smoot J.C., Lux-Migliaccio C.A., Ricklefs S.M., Hua S., Cousins D.V., Graviss E.A., Shashkina E., Kreiswirth B.N. & Musser J.M. (2002) Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 162.
- Hacker J. & Kaper J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
- Hajri A., Brin C., Hunault G., Lardeux F., Lemaire C., Manceau C., Boureau T. & Poussier S. (2009) A "repertoire for repertoire" hypothesis: repertoires of type three effectors are candidate determinants of host specificity in *Xanthomonas*. *PLoS One* 4: e6632.
- Hartung J.S. (1992) Plasmid-based hybridization probes for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. *Plant Dis.* 76: 889-893.
- Hauben L., Vauterin L., Swings J. & Moore E.R.B. (1997) Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 328-335.
- Hayward A.C. & Waterston J.M. (1964) *Xanthomonas vesicatoria*. *CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria* 20.
- Hayward A.C. (1993) The hosts of *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (eds). London: Chapman & Hall, pp. 1-119.
- He S.Y., Nomura K. & Whittam T.S. (2004) Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1694: 181-206.
- Hert A.P., Roberts P.D., Momol M.T., Minsavage G.V., Tudor-Nelson S.M. & Jones J.B. (2005) Relative importance of bacteriocin-like genes in antagonism of *Xanthomonas perforans* tomato race 3 to *Xanthomonas euvesicatoria* tomato race 1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3581-3588.
- Heuer H., Yin Y.N., Xue Q.Y., Smalla K. & Guo J.H. (2007) Repeat domain diversity of avrBs3-like genes in *Ralstonia solanacearum* strains and association with host preferences in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4379-4384.
- Hildebrand D.C., Palleroni N.J. & Schroth M.N. (1990) Deoxyribonucleic acid relatedness of 24 xanthomonad strains representing 23 *Xanthomonas campestris* pathovars and *Xanthomonas fragariae*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 263-269.
- Hirano S.S. & Upper C.D. (1983) Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol* 21: 243-269.

- Hong Y., Garcia M., Levisohn S., Lysnyansky I., Leiting V., Savelkoul P.H.M. & Kleven S.H. (2005) Evaluation of amplified fragment length polymorphism for differentiation of avian *Mycoplasma* species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 909-912.
- Hu X., Lai F.M., Reddy A.S.N. & Ishimaru C.A. (1995) Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 85: 1468-1473.
- Huson D.H. (1998) SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 14: 68-73.
- Jacques M. (1996) Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. *Trends Microbiol.* 4: 408-410.
- Janse J.D., Rossi M.P., Gorkink R.F.J., Derks J.H.J., Swings J., Janssens D. & Scortichini M. (2001) Bacterial leaf blight of strawberry (*Fragaria* (X) *ananassa*) caused by a pathovar of *Xanthomonas arboricola*, not similar to *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King. Description of the causal organism as *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae* (pv. nov., comb. nov.). *Plant Pathol.* 50: 653-665.
- Janse J.D. (2005) Standardization, validation and approval of test methods for quarantine bacteria: examples of harmonization in plant health laboratories in Europe. *Phytopathol. Pol.* 35: 19-27.
- Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M. & Kersters K. (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology - UK* 142: 1881-1893.
- Ji P., Campbell H.L., Kloepper J.W., Jones J.B., Suslow T.V. & Wilson M. (2006) Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under Weld conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 36: 358-367.
- Jones J.B., Pohronezny K.L., Stall R.E. & Jones J.P. (1986) Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida on tomato crop residue, weeds, seeds, and volunteer tomato plants. *Phytopathology* 76: 430-434.
- Jones J.B. & Scott J.W. (1986) Hypersensitive response in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Dis.* 70: 337-339.
- Jones J.B., Woltz S.S., Jones J.P. & Portier K.L. (1991) Population dynamics of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato leaflets treated with copper bactericides. *Phytopathology* 81: 714-719.
- Jones J.B., Chase A.R. & Harris G.K. (1993) Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant pathogenic bacteria. *Plant Dis.* 77: 553-558.
- Jones J.B., Stall R.E., Scott J.W., Somodi G.C., Bouzar H. & Hodge N.C. (1995) A third tomato race of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Dis.* 79: 395-398.
- Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E. & Zitter T.A. (1997) *Compendium of Tomato Diseases*. St Paul: APS Press.
- Jones J.B., Bouzar H., Somodi G.C., Stall R.E., Pernezny K., El Morsy G. & Scott J.W. (1998) Evidence for the preemptive nature of tomato race 3 of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in Florida. *Phytopathology* 88: 33-38.
- Jones J.B., Bouzar H., Stall R.E., Almira E.C., Roberts P.D., Bowen B.W., Sudberry J., Strickler P.M. & Chun J. (2000) Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1211-1219.
- Jones J.B., Minsavage G.V., Roberts P.D., Johnson R.R., Kousik C.S., Subramanian S. & Stall R.E. (2002) A non-hypersensitive resistance in pepper to the bacterial spot pathogen is associated with two recessive genes. *Phytopathology* 92: 273-277.
- Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E. & Schaad N.W. (2004) Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 755-762.
- Jones J.D.G. & Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kato-Maeda M., Gao Q. & Small P.M. (2001) Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell. Microbiol.* 3: 713-719.
- Kay S. & Bonas U. (2009) How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant. *Curr. Opin. Microbiol.* 12: 37-43.

- Kearney B. & Staskawicz B.J. (1990) Characterization of IS476 and its role in bacterial spot disease of tomato and pepper. *J. Bacteriol.* 172: 143-148.
- Kelman A. (1990) New trends in phyto bacteriology. In *Plant Pathogenic Bacteria*. Vol. A. Klement, Z. (ed.): Akademiai Kiado Budapest, Hungary, pp. 3-9.
- Kim B.S. & Hartmann R.W. (1985) Inheritance of a gene (*Bs3*) conferring hypersensitive resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper (*Capsicum annum*). *Plant Dis.* 69: 233-235.
- Kim J.G., Taylor K.W., Hotson A., Keegan M., Schmelz E.A. & Mudgett M.B. (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas*-infected tomato leaves. *Plant Cell* 20: 1915-1929.
- Kimura M. (1983) The neutral theory of molecular Evolution. *Cambridge University Press, Cambridge*
- Koenraadt H., Van Betteray B., Germain R., Hiddink G., Jones J.B., Oosterhof J., Rijlaarsdam A., Roorda P. & Woudt B. (2009) Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. *Acta Horticulturae* 808: 99-102.
- Kogovsek P., Gow L., Pompe-Novak M., Gruden K., Foster G.D., Boonham N. & Ravnikar A. (2008) Single-step RT real-time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates. *J. Virol. Methods* 149: 1-11.
- Konstantinidis K.T. & Tiedje J.M. (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 2567-2572.
- Kousik C.S. & Ritchie D.F. (1998) Response of bell pepper cultivars to bacterial spot pathogen races that individually overcome major resistance genes. *Plant Dis.* 82: 181-186.
- Kuflu K.M. & Cuppels D.A. (1997) Development of a diagnostic DNA probe for xanthomonads causing bacterial spot of peppers and tomatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4462-4470.
- Lang J.M., Hamilton J.P., Diaz M.G.Q., Van Sluys M.A., Burgos M.R.G., Vera Cruz C.M., Buell C.R., Tisserat N.A. & Leach J.E. (2010) Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Disease* 94: 311-319.
- Lawrence J.G. & Ochman H. (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9413-9417.
- Leben C. (1965) Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3: 209-230.
- Leben C. (1981) How plant-pathogenic bacteria survive. *Plant Dis.* 65: 633-637.
- Lecointre G., Le Guyader H. & Visset D. (2001) *Classification phylogénétique du vivant*. Berlin: Belin.
- Lee J.J., Crosby K.M., Pike L.M., Yoo K.S. & Leskovar D.L. (2005) Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Scientia Horticulturae* 106: 341-352.
- Lefevre P., Martin D.P., Hoareau M., Naze F., Delatte H., Thierry M., Varsani A., Becker N., Reynaud B. & Lett J.M. (2007) Begomovirus 'melting pot' in the south-west Indian Ocean islands: molecular diversity and evolution through recombination. *J. Gen. Virol.* 88: 3458-3468.
- Leite R.P., Jones J.B., Somodi G.C., Minsavage G.V. & Stall R.E. (1995) Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Dis.* 79: 917-922.
- Lepoivre P. (2003) *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Bruxelles: De Boeck.
- Lima W.C., Van Sluys M.A. & Menck C.F.M. (2005) Non gamma-proteobacteria gene islands contribute to the *Xanthomonas* genome. *Omics* 9: 160-172.
- Lima W.C. & Menck C.F.M. (2008) Replacement of the arginine biosynthesis operon in Xanthomonadales by lateral gene transfer. *J. Mol. Evol.* 66: 266-275.
- Lima W.C., Paquola A.C.M., Varani A.M., Van Sluys M.-A. & Menck C.F.M. (2008) Laterally transferred genomic islands in Xanthomonadales related to pathogenicity and primary metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 281: 87-97.
- Lindemann J. & Upper C.D. (1985) Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1229-1232.

- Lopez M., Bertolini E., Marco-Noales E., Llop P. & Cambra M. (2006) Update on molecular tools for detection of plant pathogenic bacteria and viruses. In *Molecular diagnostics current technology and application*. Rao, J.R., Fleming, C.C. & Moore, J.E. (eds). Wymondham: Horizon bioscience, pp. 1-46.
- Lopez M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M. & Bertolini E. (2009) Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses ? *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 13-46.
- Lopez M.M., Bertolini E., Caruso P., Penyalver R., Marco-Noales E., Gorris M.T., Morente C., Salcedo C., Cambra M. & Llop P. (2005) Advantages of an integrated approach for diagnosis of quarantine pathogenic bacteria in plant material. *Phytopathol. Pol.* 35: 49-56.
- Loreti S., Gallelli A., Belisario A., Wajnberg E. & Corazza L. (2001) Investigation of genomic variability of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by AFLP analysis. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 583-591.
- Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T. & Debruijn F.J. (1995) Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 85: 528-536.
- Louws F.J., Rademaker J.L.W. & De Bruijn F.J. (1999) The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogens : diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Louws F.J., Wilson M., Campbell H.L., Cuppels D.A., Jones J.B., Shoemaker P.B., Sahin F. & Miller S.A. (2001) Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator. *Plant Dis.* 85: 481-488.
- Maiden M.C.J., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russel J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M. & Spratt B.G. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3140-3145.
- Marchandin H., Teyssier C., de Buochberg M.S., Jean-Pierre H., Carriere C. & Jumas-Bilak E. (2003) Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella*: implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* 149: 1493-1501.
- Marcuzzo L.L., Becker W.F. & Fernandes J.M.C. (2009) Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. *Summa Phytopathol* 35: 132-135.
- Marmur J. & Doty P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5: 109-118.
- Marois E., Van den Ackerveken G. & Bonas U. (2002) The *Xanthomonas* type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 637-646.
- Martin R.R., Delano J. & Lévesque C.A. (2000) Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38.
- Mavrodieva V., Levy L. & Gabriel D.W. (2004) Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology* 94: 61-68.
- McGuire R., Jones J.B. & Scott J.W. (1991) Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on tomato cultigens resistant and susceptible to bacterial spot. *Plant Dis.* 75: 606-609.
- McInnes T.B., Gitaitis R.D., McCarter S.M., Jaworski C.A. & Phatak S.C. (1988) Airborne dispersal of bacteria in tomato and pepper transplant fields. *Plant Dis.* 72: 575-579.
- Meksem K., Ruben E., Hyten D., Triwitayakorn K. & Lightfoot D.A. (2001) Conversion of AFMLP bands into high-throughput DNA markers. *Mol. Genet. Genomics* 265: 207-214.
- Melotto M., Underwood W. & He S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46: 101-122.
- Meng X.Q., Umesh K.C., Davis R.M. & Gilbertson R.L. (2004) Development of PCR-based assays for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *carotae*, the carrot bacterial leaf blight pathogen, from different substrates. *Plant Dis.* 88: 1226-1234.

- Merighi M., Sandrini A., Landini S., Ghini S., Girotti S., Malaguti S. & Bazzi C. (2000) Chemiluminescent and colorimetric detection of *Erwinia amylovora* by immunoenzymatic determination of PCR amplicons from plasmid pEA29. *Plant Dis.* 84: 49-54.
- Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F. & Lafon R. (1991) *Les maladies des plantes maraîchères*. Paris: Quae.
- Metz M., Dahlbeck D., Morales C.Q., Al Sady B., Clark E.T. & Staskawicz B.J. (2005) The conserved *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* effector protein XopX is a virulence factor and suppresses host defense in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 41: 801-814.
- Meyer D.F. & Bogdanove A.J. (2009) Genomic-driven advances in *Xanthomonas* biology. In *Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular Biology*. Jackson, R.W. (ed). Norfolk, UK: Caster Academic Press, pp. 147-161.
- Minsavage G.V., Dahlbeck D., Whalen M.C., Kearney B., Bonas U., Staskawicz B.J. & Stall R.E. (1990) Gene-for-gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 41-47.
- Minsavage G.V., Jones J.B. & Stall R.E. (1996) Cloning and sequencing of a avirulence gene (*avrRxv3*) isolated from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tomato race 3. *Phytopathology* 86: S15.
- Minsavage G.V., Balogh B. & Stall R.E. (2003) New tomato races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with mutagenesis of tomato race 3 strains. *Phytopathology* 93: S62.
- Mirk M. & Aysan Y. (2009) Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* in naturally infected pepper seeds in Turkey. *J. Plant Pathol.* 91: 433-436.
- Moretti C., Amatulli M.T. & Buonauro R. (2009) PCR-based assay for the detection of *Xanthomonas euvesicatoria* causing pepper and tomato bacterial spot. *Lett. Appl. Microbiol.* 49: 466-471.
- Mumford R., Boonham N., Tomlinson J. & Barker I. (2006) Advances in molecular phytodiagnostics - new solutions for old problems. *Eur. J. Plant Pathol.* 116: 1-19.
- Munkvold G.P. (2009) Seed pathology progress in academia and industry. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 285-311.
- Nagamine K., Hase T. & Notomi T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probe.* 16: 223-229.
- Nakamura Y., Itoh T., Matsuda H. & Gojobori T. (2004) Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature Genet.* 36: 760-766.
- Naser S.M., Thompson F.L., Hoste B., Gevers D., Dawyndt P., Vancanneyt M. & Swings J. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology - SGM* 151: 2141-2150.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. & Yonekawa T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: e63.
- Obradovic A., Jones J.B., Momol M.T., Balogh B. & Olson S.M. (2004a) Management of tomato bacterial spot in the field by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. *Plant Dis.* 88: 736-740.
- Obradovic A., Marvidis A. & Rudolph K. (2004b) Characterization and PCR-based typing of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* from pappars and tomato in Serbia. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 285-292.
- Obradovic A., Jones J.B., Balogh B. & Momol M.T. (2008) Integrated management of tomato bacterial spot. In *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*. Ciancio, A. & Mukerji, G.K. (eds). Dordrecht: Springer, pp. 211-223.
- Palleroni N.J., Hildebrand D.C., Schroth M.N. & Henderson M. (1993) Deoxyribonucleic acid relatedness of 21 strains of *Xanthomonas* species and pathovars. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 441-446.
- Park D.S., Shim J.K., Kim J.S., Lim C.K., Shrestha R., Hahn J.H. & Kim H.G. (2009) Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by PCR using pathovar-specific primers based on *rhs* family gene sequences. *Microbiol. Res.* 1641.
- Parkinson N., Aritua V. & Heeney J. (2007) Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2881-2887.
- Parkinson N., Cowie C., Heeney J. & Stead D. (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 264-274.

- Pasquini G., Barba M., Hadidi A., Faggioli F., Negri R., Sobol I., Tiberini A., Caglayan K., Mazyad H., Anfoka G., Ghanim M., Zeidan M. & Czosnek H. (2008) Oligonucleotide microarray-based detection and genotyping of Plum pox virus. *J. Virol. Methods* 147: 118-126.
- Patil P.B., Bogdanove A.J. & Sonti R.V. (2007) The role of horizontal transfer in the evolution of a highly variable lipopolysaccharide biosynthesis locus in xanthomonads that infect rice, citrus and crucifers. *BMC Evol. Biol.* 7: 243.
- Peralta I.E. & Spooner D.M. (2001) Granule-Bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *Am. J. Bot.* 88: 1888-1902.
- Peralta I.E., Knapp S. & Spooner D.M. (2006) Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Report of the tomato genetics cooperative* 56: 5-12.
- Pernezny K. & Collins J. (1997) Epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper: relationships to host-plant resistance and exposure to copper sprays. *Plant Dis.* 81: 791-794.
- Pernezny K., Roberts P.D., Murphy J.F. & Goldberg N.P. (2003) *Compendium of Pepper Diseases*. St. Paul: APS Press.
- Pieretti I., Royer M., Barbe V., Carrere S., Koebnik R., Cociancich S., Couloux A., Darrasse A., Gouzy J., Jacques M.A., Lauber E., Manceau C., Mangenot S., Poussier S., Segurens B., Szurek B., Verdier V., Arlat M. & Rott P. (2009) The complete genome sequence of *Xanthomonas albilineans* provides new insights into the reductive genome evolution of the xylem-limited Xanthomonadaceae. *BMC Genomics* 10: 616.
- Pohronezny K., Moss M.A., Dankers W. & Schenk J. (1990) Dispersal and management of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* during thinning of direct - seeded tomato. *Plant Dis.* 74: 800-805.
- Pohronezny K., Hewitt M., Infante J. & Datnoff L. (1992) Wind and wind - generated sand injury as factors in infection of pepper by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Dis.* 76: 1036-1039.
- Poitras E. & Houde A. (2002) La PCR en temps réel : principes et applications. *Review in biology and Biotechnology* 2: 2-11.
- Puchta H. & Sanger H.L. (1989) Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reaction (PCR). *Arch. Virol.* 106: 335-340.
- Punina N.V., Ignatov A.N., Pekhtereva E.S., Kornev K.P., Matveeva E.V., Polityko N.I. & Schaad N.W. (2009) Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in the Russian federation. *Acta Horticulturae* 808: 287-290.
- Qu L., Li X., Wu G. & Yang N. (2005) Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 26: 99-101.
- Quezado-Duval A.M., Leite Jr. R.P., Truffi D. & Camargo L.E.A. (2004) Outbreaks of bacterial spot caused by *Xanthomonas gardneri* on processing tomato in central-west Brazil. *Plant Dis.* 88: 157-161.
- Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swings J., Vauterin L., Vauterin P. & De Bruijn F.J. (2000) Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 665-677.
- Rademaker J.L.W., Louws F.J., Schultz M.H., Rossbach U., Vauterin L., Swings J. & De Bruijn F.J. (2005) A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology* 95: 1098-1111.
- Radisek S., Jakse J. & Javornik B. (2004) Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from hop. *Plant Dis.* 88: 1115-1122.
- Ragan M.A. (2001) Detection of lateral gene transfer among microbial genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 620-626.
- Rajagopal L., Sundari C.S., Balasubramanian D. & Sonti R.V. (1997) The bacterial pigment xanthomonadin offers protection against photodamage. *FEBS Lett.* 415: 125-128.
- Ramos L.J. & Volin R.B. (1987) Role of stomatal opening and frequency on infection of *Lycopersicon* spp. by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Phytopathology* 77: 1311-1317.
- Restrepo S., Duque M., Tohme J. & Verdier V. (1999) AFLP fingerprinting: an efficient technique for detecting genetic variation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Microbiology - UK* 145: 107-114.

- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R. & Baranton G. (2006) Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873-881.
- Ridé M. & Ridé S. (1992) *Xanthomonas populi* (ex Ridé 1958) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 652-653.
- Rigano L.A., Marano M.R., Castagnaro A.P., Do Amaral A.M. & Vojnov A.A. (2010) Rapid and sensitive detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification combined with simple visual evaluation methods. *BMC Microbiol.* 10: 176.
- Risterucci A.M., Grivet L., N'Goran J.A.K., Pieretti I., Flament M.H. & Lanaud C. (2000) A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor. Appl. Genet.* 101: 948-955.
- Ritchie D.F. & Dittapongpich V. (1991) Copper - and streptomycin - resistant strains and host differentiated races of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in North Carolina. *Plant Dis.* 75: 733-736.
- Robbins M.D., Darrigues A., Sim S.C., Mohammed Abu Taher Masud & Francis D.M. (2009) Characterization of hypersensitive resistance to bacterial spot race T3 (*Xanthomonas perforans*) from tomato accession PI 128216. *Phytopathology* 99: 1037-1044.
- Robène-Soustrade I., Laurent P., Gagnevin L., Jouen E. & Pruvost O. (2006) Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* in anthurium (*Anthurium andreanum*) tissues by nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1072-1078.
- Robène-Soustrade I., Legrand D., Gagnevin L., Chiroleu F., Laurent A. & Pruvost O. (2010) Multiplex nested PCR for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* from onion seeds. *Applied. Environ. Microbiol.* 76: 2697-2703.
- Romantschuk M., Roine E., Ojanen T., Van Doorn J., Louhelainen J., Nurmiaho-Lassila E.L. & Haahtela K. (1994) Fimbria (Pilus) mediated attachment of *Pseudomonas syringae*, *Erwinia rhapontici* and *Xanthomonas campestris* to plant surfaces. In *Molecular mechanisms of bacterial virulence*. Kado, C.I. (ed). Dordrecht: Kluwer academic, pp. 67-77.
- Romer P., Hahn S., Jordan T., Strauss T., Bonas U. & Lahaye T. (2007) Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* 318: 645-648.
- Ronald P. & Staskawicz B.J. (1988) The avirulence gene *avrBs1* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* encodes a 50-kD protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 191-198.
- Rott P.C., Costet L., Davis M.J., Frutos R. & Gabriel D.W. (1996) At least two separate gene clusters are involved in albicidin production by *Xanthomonas albilineans*. *J. Bacteriol.* 178: 4590-4596.
- Roudière L., Lorto S., Tallagrand E., Marchandin H., Jeannot J.-L. & Jumas-Bilak E. (2007) Molecular fingerprint of bacterial communities and 16S rDNA intra-species heterogeneity: a pitfall that should be considered. *Pathol. Biol.* 55: 434-440.
- Roumagnac P., Gagnevin L., Gardan L., Sutra L., Manceau C., Dickstein E.R., Jones J.B., Rott P. & Pruvost O. (2004) Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 15-24.
- Rudolph K. (1993) Infection of the plant by *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (eds). London: Chapman & Hall, pp. 193-264.
- Saddler G.S. & Bradbury J.F. (2005) Family I. Xanthomonadae fam. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition*. Vol. 2. Garrity, G.M., Brenner, D.G., Krieg, N.R. & Staley, J.T. (eds). New York: Springer, pp. 63-90.
- Sahin F. & Miller S.A. (1996) Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Dis.* 80: 773-778.
- Sahin F. & Miller S.A. (1998) Resistance in *Capsicum pubescens* to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* pepper race 6. *Plant Dis.* 82: 794-799.
- Sakthivel N., Mortensen C.N. & Mathur S.B. (2001) Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 435-441.

- Schaad N.C. (1976) Immunological comparison and characterization of ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*. *Phytopathology*.
- Schaad N.C. & Frederick R.D. (2002) Real-Time PCR and its application for rapide plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.* 24: 250-258.
- Schaad N.C., Frederick R.D., Shaw J., Schneider W.L., Hickson R., Petrillo M.D. & Luster D.G. (2003) Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 305-324.
- Schaad N.W., Berthier-Schaad Y., Sechler A. & Knorr D. (1999) Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.* 83: 1095-1100.
- Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G.H., Sechler A., Agarkova I., Stromberg P.E., Stromberg V.K. & Vidaver A.K. (2005) Reclassification of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (ex Hasse 1915) Dye 1978 forms A, B/C/D, and E as *X. smithii* subsp. *citri* (ex Hasse) sp. nov. nom. rev. comb. nov., *X. fuscans* subsp. *aurantifolii* (ex Gabriel 1989) sp. nov. nom. rev. comb. nov., and *X. alfalfae* subsp. *citrumelo* (ex Riker and Jones) Gabriel et al., 1989 sp. nov. nom. rev. comb. nov.; *X. campestris* pv. *malvacearum* (ex Smith 1901) Dye 1978 as *X. smithii* subsp. *smithii* nov. comb. nov. nom. nov.; *X. campestris* pv. *alfalfae* (ex Riker and Jones, 1935) Dye 1978 as *X. alfalfae* subsp. *alfalfae* (ex Riker et al., 1935) sp. nov. nom. rev.; and "var. *fuscans*" of *X. campestris* pv. *phaseoli* (ex Smith, 1987) Dye 1978 as *X. fuscans* subsp. *fuscans* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 28: 494-518.
- Schaad N.W., Postnikova E., Lacy G.H., Sechler A., Agarkova I., Stromberg P.E., Stromberg V.K. & Vidaver A.K. (2006) Emended classification of xanthomonad pathogens on citrus. *Syst. Appl. Microbiol.* 29: 690-695.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W. & Brown P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schork N.J., Fallin D. & Lanchbury J.S. (2000) Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin. Genet.* 58: 250-264.
- Schornack S., Bellvora A., Gurlebeck D., Peart J. & Ganai M. (2004) The Tomato resistance proteine Bs4 is a predicted non-nuclear TIR-NB-LRR protein that mediates defense reponses to severely truncated derivatives of the avrBs4 and overexpressed AvrBs3. *Plant* 37: 46-60.
- Schornack S., Minsavage G.V., Stall R.E., Jones J.B. & Lahaye T. (2008) Characterization of AvrHah1, a novel AvrBs3-like effector from *Xanthomonas gardneri* with virulence and avirulence activity. *New Phytol.* 179: 546-556.
- Scott J.W., Jones J.B., Somodi G.C. & Stall R.E. (1995) Screening tomato accessions for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, race T3. *Hort. Sci.* 30: 579-581.
- Sharon E., Bashan Y., Okon Y. & Henis Y. (1982a) Presymptomatic multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on the surface of pepper leaves. *Can. J. Bot.* 60: 1041-1045.
- Sharon E., Okon Y., Bashan Y. & Henis Y. (1982b) Detached leaf enrichment : a method for detecting small numbers of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in seed and symptomless leaves of tomato and pepper. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 371-377.
- Sherbakoff C.D. (1918) Report of the associate plant pathologist. *Fla. Agric. Exp. Stn. Rep* 1916-1917: 66R-86R.
- Simpson A.J.G., Reinach F.C., Arruda P., Abreu F.A., Acencio M., Alvarenga R., Alves L.M.C., Araya J.E., Baia G.S., Baptista C.S., Barros M.H., Bonaccorsi E.D., Bordin S., Bové J.M., Briones M.R.S., Bueno M.R.P., Camargo A.A., Camargo L.E.A., Carraro D.M., Carrer H., Colauto N.B., Colombo C., Costa F.F., Costa M.C.R., Costa-Neto C.M., Coutinho L.L., Cristofani M., Dias-Neto E., Docena C., El-Dorry H., Facincani A.P., Ferreira A.J.S., Ferreira V.C.A., Ferro J.A., Fraga J.S., França S.C., Franco M.C., Frohme M., Furlan L.R., Garnier M., Goldman G.H., Goldman M.H.S., Gomes S.L., Gruber A., Ho P.L., Hoheisel J.D., Junqueira M.L., Kemper E.L., Kitajima J.P., Krieger J.E., Kuramae E.E., Laigret F., Lambais M.R., Leite L.C.C., Lemos E.G.M., Lopes S.A., Lopes C.R., Machado J.A., Machado M.A., Madeira A.M.B.N., Madeira H.M.F., Marino C.L., Marques M.V., Martins E.A.L., Martins E.M.F., Matsukuma A.Y., Menck C.F.M., Miracca E.C., Miyaki C.Y., Monteiro-Vitorello C.B., Moon D.H., Nagai M.A., Nascimento A.L.T.O., Netto L.E.S., Nhani A.J., Nobrega F.G., Nunes L.R., Oliveira M.A., De Oliveira M.C., De Oliveira R.C., Palmieri D.A., Paris A., Peixoto B.R., Pereira G.A.G., Pereira

- H.A.J., Pesquero J.B., Quaggio R.B., Roberto P.G., Rodrigues V., De Rosa A.J., De Rosa V.E.J., De Sa R.G., Santelli R.V., Sawasaki H.E., Da Silva A.C.R., Da Silva A.M., Da Silva F.R., Silva W.A.J., Da Silveira J.F., Silvestri M.L.Z., Siqueira W.J., De Souza A.A., De Souza A.P., Terenzi M.F., Truffi D., Tsai S.M., Tshako M.H., Vallada H., Van Sluys M.A., Verjovski-Almeida S., Vettore A.L., Zago M.A., Zatz M., Meidanis J. & Setubai J.C. (2000) The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151-157.
- Skerman V.B.D., McGowan V. & Sneath P.H.A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 22-420.
- Spooner D.M., Peralta I.E. & Knapp S. (2005) Comparaison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solanum* L. section *Lycopersicon* (Mill.) Wettst.]. *Taxon* 54: 43-61.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kampf P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. & Whitman W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.
- Stall R.E. & Civerolo E.L. (1993) *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (eds). London Glasgow New York Tokyo Melbourne Madras: Chapman & Hall, pp. 57-60.
- Stall R.E., Gottwald T.R., Koizumi M. & Schaad N.C. (1993) Ecology of plant pathogenic xanthomonads. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (eds). London: Chapman & Hall, pp. 265-299.
- Stall R.E., Beaulieu C., Egel D., Hodge N.C., Leite R.P., Minsavage G.V., Bouzar H., Jones J.B., Alvarez A.M. & Benedict A.A. (1994) Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 47-53.
- Stall R.E., Jones J.B. & Minsavage G.V. (2009) Durability of resistance in tomato and pepper to xanthomonads causing bacterial spot. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 265-284.
- Starr M.P. (1981) The genus *Xanthomonas*. In *The prokaryotes : a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*. Starr, Stolp, Trüper, Balows & Schlegel (eds). Berlin Heidelberg New York: Springer -Verlag, pp. 742-763.
- Suerbaum S., Maynard-Smith J., Bapumia K., Morelli G., Smith N.H., Kunstmann E., Dyrek I. & Achtman M. (1998) Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12619-12624.
- Suoniemi A., Bjorklof K., Haahtela K. & Romantschuk M. (1995) Pili of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* enhance initiation of bacterial epiphytic colonization of bean. *Microbiology - UK* 141: 497-503.
- Susko E., Leigh J., Doolittle W.F. & Baptiste E. (2006) Visualizing and assessing phylogenetic congruence of core gene sets: a case study of β -Proteobacteria. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1019-1030.
- Swings J., Van Den Mooter M., Vauterin L., Hoste B., Gillis M., Mew T.W. & Kersters K. (1990) Reclassification of the causal agents of bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) and bacterial leaf streak (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*) as pathovars of *Xanthomonas oryzae* (ex Ishiyama 1922) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 309-311.
- Tao S.-C., Jiang D., Lu H.-L., Xing W.-L., Zhou Y.-X. & Cheng J. (2004) One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. *Biotechnol. Lett.* 26: 179-183.
- Thieme F., Koebnik R., Bekel T., Berger C., Boch J., Buttner D., Caldana C., Gaigalat L., Goesmann A., Kay S., Kirchner O., Lanz C., Linke B., McHardy A.C., Meyer F., Mittenhuber G., Nies D.H., Niesbach-Klosgen U., Patschkowski T., Ruckert C., Rupp O., Schneiker S., Schuster S.C., Vorholter F.J., Weber E., Puhler A., Bonas U., Bartels D. & Kaiser O. (2005) Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J. Bacteriol.* 187: 7254-7266.
- Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C., Dawyndt P., Naser S., Hoste B., Munn C.B. & Swings J. (2005) Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5107-5115.
- Timmer L.W., Marois J.J. & Achor D. (1987) Growth and survival of xanthomonads under conditions nonconducive to disease development. *Phytopathology* 77: 1341-1345.

- Trébaol G., Gardan L., Manceau C., Tanguy J.L., Tirilly Y. & Boury S. (2000) Genomic and phenotypic characterization of *Xanthomonas cynarae* : a new species causing bacterial bract spot of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1471-1478.
- Van den Mooter M. & Swings J. (1990) Numerical analysis of 295 phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and related strains and an improved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 348-369.
- Van der Wolf J.M., Hyman L.J., Jones D.A.C., Grevesse C., Van Beckhoven J.R.C.M., Van Vuurde J.W.L. & Perombelon M.C.M. (1996) Immunomagnetic separation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* from potato peel extracts to improve detection sensitivity on a crystal violet pectate medium of by PCR. *J. appl. Bacteriol.* 80: 487-495.
- Van Doorn J., Hollinger T.C. & Oudega B. (2001) Analysis of the type IV fimbrial-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: Application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinths. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 598-607.
- Van Sluys M.A., Monteiro-Vitorello C.B., Camargo L.E.A., Menck C.F.M., Da Silva A.C.R., Ferro J.A., Oliveira M.C., Setubal J.C., Kitajima J.P. & Simpson A.J. (2002) Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 169-189.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. & Swings J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60: 407-438.
- Vandroemme J., Baeyen S., Van Vaerenbergh J., De Vos P. & Maes M. (2008) Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants. *Plant Pathol.* 57: 438-444.
- Vauterin L., Swings J., Gillis M., Kersters K., Mew T.W., Schroth M.N., Palleroni N.J., Hildebrand D.C., Stead D.E., Civerolo E.L., Hayward A.C., Maraite H., Stall R.E., Vidaver A.K. & Bradbury J.F. (1990) Towards an improved taxonomy of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 312-316.
- Vauterin L., Swings J. & Kersters K. (1991) Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1677-1687.
- Vauterin L., Hoste B., Yang P., Alvarez A., Kersters K. & Swings J. (1993) Taxonomy of the genus *Xanthomonas*. In *Xanthomonas*. Swings, J.G. & Civerolo, E.L. (eds). London: Chapman & Hall, pp. 157-192.
- Vauterin L., Hoste B., Kersters K. & Swings J. (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 472-489.
- Vauterin L., Yang P. & Swings J. (1996) Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 298-304.
- Verdier V. & Mosquera G. (1999) Specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* with a DNA hybridization probe. *J. Phytopathol.* 147: 417-423.
- Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic J., De Bruijn F.J. & Lupski J.R. (1998) Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In *Bacterial Genomes*. De Bruijn, F.J., Lupski, J.R. & Weinstock, G.M. (eds). New York: Chapman & Hall, pp. 437-454.
- Vinatzer B.A., Teitzel G.M., Lee M.W., Jelenska J., Hotton S., Fairfax K., Jenrette J. & Greenberg J.T. (2006) The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. *Mol. Microbiol.* 62: 26-44.
- von Bodman S.B., Bauer W.D. & Coplin D.L. (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 455-482.
- Vos M. & Didelot X. (2009) A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J.* 3: 199-208.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Vandelee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. (1995) AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wang L.H., He Y.W., Gao Y.F., Wu J.E., Dong Y.H., He C.Z., Wang S.X., Weng L.X., Xu J.L., Tay L., Fang R.X. & Zhang L.H. (2004) A bacterial cell-cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Mol. Microbiol.* 51: 903-912.

- Ward E., Foster S.J., Fraaije B.A. & McCartney H.A. (2004) Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Ann. Appl. Biol.* 145: 1-16.
- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichewsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackenbrandt E., Starr M.P. & Truper H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation on approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.
- Whalen M.C., Wang J.F., Carland F.M., Heiskell M.E., Dahlbeck D., Minsavage G.V., Jones J.B., Scott J.W., Stall R.E. & Staskawicz B.J. (1993) Avirulence gene *Avrrxv* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* specifies resistance on tomato line Hawaii 7998. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 616-627.
- White F.F., Potnis N., Jones J.B. & Koebnik R. (2009) The type III effectors of *Xanthomonas*. *Mol. Plant Pathol.* 10: 749-766.
- White H.E. (1930) Bacterial spot of radish and turnip. *Phytopathology* 20: 653-662.
- Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L. & Salmond G.P.C. (2001) Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365-404.
- Wichmann G. & Bergelson J. (2004) Effector genes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* promote transmission and enhance other fitness traits in the field. *Genetics* 166: 693-706.
- Wichmann G., Ritchie D., Kousik C.S. & Bergelson J. (2005) Reduced genetic variation occurs among genes of the highly clonal plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*, including the effector gene *avrBs2*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2418-2432.
- Woese C.R. & Fox G.E. (1977) Phylogenetic Structure of the Prokaryotic Domain: The Primary Kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090.
- Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 51: 221-271.
- Yao J., Lin H., Doddapaneni H. & Civerolo E.L. (2007) nWayComp: A genome-wide sequence comparison tool for multiple strains/species of phylogenetically related microorganisms. *In Silico Biology* 7: 195-200.
- Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G. & Robbs C.F. (1978) A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. *N. Z. J. Agric. Res.* 21: 153-177.
- Young J.M., Takikawa Y., Gardan L. & Stead D.E. (1992) Changing concepts in the taxonomy of plant pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 67-105.
- Young J.M., Park D.C., Shearman H.M. & Fargier E. (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* 31: 366-377.
- Young J.M., Wilkie J.P., Park D.C. & Watson D.R.W. (2010) New Zealand strains of plant pathogenic bacteria classified by multi-locus sequence analysis; proposal of *Xanthomonas dyei* sp. nov. *Plant Pathol.* 59: 270-281.
- Yu Z.H., Wang J.F., Stall R.E. & Vallejos C.E. (1995) Genomic localization of tomato genes that control a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. *Genetics* 141: 675-682.
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. & Durner J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 15811-15816.
- Zhu P., Van der Ende A., Falush D., Brieske N., Morelli G., Linz B., Popovic T., Schuurman I.G.A., Adegbola R.A., Zurth K., Gagneux S., Platonov A.E., Riou J.Y., Caugant D.A., Nicolas P. & Achtman M. (2001) Fit genotypes and escape variants of subgroup III *Neisseria meningitidis* during three pandemics of epidemic meningitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5234-5239.
- Zipfel C. & Felix G. (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 353-360.

Abstract

Bacterial spot disease of Solanaceae is present in most areas of the world where tomato and pepper are cultivated. Its incidence is especially high in tropical and subtropical regions, such as the islands of the South West Indian Ocean. This disease can be caused by five taxa : *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* and *X. campestris* pv. *raphani*, but recent studies suggest that some of those species are synonymous or actually correspond to other species of *Xanthomonas*. The objectives of this work were (1) to assess the genetic diversity of a world collection of strains using two high throughput molecular techniques : AFLP and MLSA; (2) to describe the phylogenetic relationships between the different taxa causing bacterial spot and other *Xanthomonas*; (3) to develop a rapid identification method based on SCAR markers identified by AFLP, which would take into account the global diversity of the pathogen. Tree topologies derived from the sequences of four housekeeping genes were not congruent and recombination events could be detected in three of them. A survey of bacterial spot of tomato and pepper in the South West Indian Ocean showed a broad diversity of the species causing this disease in the region. Our data confirmed the strong genetic similarity between, *X. alfalfae*, *X. euvesicatoria* and *X. perforans*, as well as between *X. cynarae* and *X. gardneri*, which are probably synonymous species.

Résumé

La gale bactérienne des Solanées à graines est une maladie répandue dans la plupart aires de production de tomate et des *Capsicum* spp. (piment, poivron) du monde. Elle est très sévère dans les régions tropicales et subtropicales et sa présence est récurrente dans la région Sud-Ouest de l'Océan Indien. Cette maladie est complexe car cinq taxons sont actuellement reconnus comme agents causaux, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* et *X. campestris* pv. *raphani*. Néanmoins certaines études récentes suggèrent des synonymies de certaines de ces espèces entre elles et également avec d'autres *Xanthomonas*. Les objectifs principaux de la thèse étaient (1) l'analyse de la diversité sur une collection mondiale à l'aide des deux techniques moléculaires à haut débit, AFLP et MLSA, avec un accent particulier sur la diversité génétique et pathologique régionale (2) la description des relations phylogénétiques entre ces taxons et les autres *Xanthomonas* (3) la mise au point d'un outil d'identification rapide qui tienne compte de la diversité de l'agent pathogène et basé sur des marqueurs SCAR identifiés par AFLP. Une absence de congruence entre les topologies d'arbres dérivées des séquences de 4 gènes de ménage étudiés a été mise en évidence, de même que plusieurs évènements de recombinaison sur trois d'entre eux. Un inventaire des espèces trouvées dans les îles SWIO a pu être dressé, mettant à jour une grande diversité dans cette région. Nos données ont confirmé de fortes similarités génétiques entre *X. alfalfae*, *X. euvesicatoria* et *X. perforans* d'une part et de *X. cynarae* et *X. gardneri* d'autre part, qui ont probablement le statut d'espèces-synonyme.